

Flagellen-vermittelte Motilität in *Shewanella*

Mechanismen zur effektiven Fortbewegung in
S. putrefaciens CN-32 und *S. oneidensis* MR-1

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich
Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sebastian Bubendorfer
aus München

Marburg (an der Lahn), 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2010 bis März 2013 am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Dr. Kai Thormann durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (HKZ: 1180) als Dissertation
angenommen am: 29.04.2013

Erstgutachter: Dr. Kai M. Thormann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter L. Graumann

Tag der mündlichen Prüfung: : 23.05.2013

Ich versichere, dass ich meine Dissertation:

**„Flagellen-vermittelte Motilität in *Shewanella*
Mechanismen zur effektiven Fortbewegung in
S. putrefaciens CN-32 und *S. oneidensis* MR-1“**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 13.04.2013

Sebastian Bubendorfer

Die im Laufe meiner Promotion entstandenen Daten sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

1. **Specificity of motor components in the dual flagellar system of *Shewanella putrefaciens* CN-32.**

Bubendorfer, S., Held, S., Windel, N., Paulick, A., Klingl, A., Thormann, K. M.
2012. *Mol Microbiol* 83(2): 335-350.

Ergebnisse aus in dieser Dissertation nicht erwähnten Projekten sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

2. **Roles of two *Shewanella oneidensis* MR-1 extracellular endonucleases.**

Gödeke, J., Heun, M., **Bubendorfer, S.**, Paul, K., Thormann, K. M.
2011. *Appl Environ Microbiol* 77(15): 5342-5351.

3. **Domain analysis of ArcS, the hybrid sensor kinase of the *Shewanella oneidensis* MR-1 Arc two-component system, reveals functional differentiation of its two receiver domains.**

Lassak, J.M., **Bubendorfer, S.**, Thormann, K.M.
2013. *J Bacteriol* 195(3): 482-492.

meinen Eltern

*Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit
einem Schlußpunkt, sondern mit einem Fragezeichen.*

Herrmann Hesse

Abstract

Bacteria move efficiently by rotating helical proteinaceous filaments called flagella. This elegant type of movement enables microorganisms to migrate towards favorable conditions in a constantly changing environment. Through chemotaxis, bacteria respond to specific stimuli and modulate function and output of their flagellar systems to be able to follow gradients. Bacteria have evolved their flagellar motility repertoire to match requirements of their specific habitats, leading to a high degree of variability of flagellation between organisms. Some bacteria elaborate secondary lateral flagella in addition to their polar flagellar systems, enabling movement through highly viscous environments or across surfaces. Strict regulatory circuits control production and maintenance of the costly lateral flagellar system.

Shewanella putrefaciens CN-32 harbors two flagellar systems assembling a Na⁺-driven polar flagellum and H⁺-driven lateral flagella. Both systems exhibit significant similarity to dual flagellar systems in other bacterial species. Surprisingly, a subpopulation of *S. putrefaciens* CN-32 elaborates one or two randomly localizing lateral flagella already during exponential growth in complex liquid media. Phenotypical analyses of defined *in frame* deletion mutants in concert with advanced fluorescence microscopy demonstrate that, despite the synchronous assembly, structural components are highly specific to their corresponding flagellar system. A single chemotaxis system specifically controls rotational switching of the bidirectional polar flagellum, but it has no influence on unidirectional rotation of lateral flagella. Rotating polar flagella is sufficient to mediate full swimming speed of single cells in liquid environment. However, cells producing additional lateral flagella display a significantly increased directed swimming behavior in liquid or structured habitats, indicating a role of lateral flagella in efficient reorientation of cell bodies in their environment. This so far unknown mode of bacterial swimming may rely on functional interaction of polar and lateral flagella and, thus, may represent a novel mechanism of exploring new habitats under certain circumstances. Additionally, the discovery of dual flagellar systems in a growing number of bacteria inhabiting aquatic environments may point towards similar flagellar functions in other organisms.

A second representative of the family of *Shewanellaceae*, *Shewanella oneidensis* MR-1, uses a single polar flagellar filament consisting of two highly homologous flagellin subunits, FlaA and FlaB, and a dual torque-generating stator system to effectively move at different sodium ion concentrations. Posttranslational modification of flagellins is essential for both the assembly of the flagellar filament and subsequent motility. Sophisticated MS-analyses in accordance with single-residue substitutions performed in this study identified at least 4 sites of O-glycosidic modification for both FlaA and FlaB. Detailed structural analyses revealed that the modification likely consists of a basal 274 Da pseudaminic-acid (Pse) derivative and a directly attached unknown moiety of 264 Da. A *S. oneidensis* MR-1-specific operon, designated as *sfmABCDE*, is involved in flagellin glycosylation. This operon is arranged within a gene region comprising glycosylation-related genes that is partially conserved among other *Shewanella* species implicating a conserved glycosylation mechanism using variable glycan moieties in a species-specific manner for these *Shewanella* strains.

In this study, I could demonstrate that a synchronously working dual flagellar system, as well as flagellin glycosylation is crucial for effective swimming of *S. putrefaciens* CN-32 and *S. oneidensis* MR-1, respectively. In summary, studying mechanisms of flagella-mediated motility in these two different *Shewanella* species may expand our knowledge about bacterial motility and has implications for the evolution of highly homologous protein complexes and interacting bacterial regulatory control circuits in response to changing environmental conditions.

Zusammenfassung

Bakterien können sich mittels der Rotation helikaler Proteinfilamente – den Flagellen – höchst effizient durch ihre Umwelt bewegen. In einer sich ständig verändernden Umgebung ermöglicht diese Art der Fortbewegung eine gerichtete Bewegung hin zu optimalen Bedingungen. Über ein breites chemosensorisches Potential nehmen Bakterien spezifische Reize wahr und reagieren durch eine Modulierung der Bewegungsmaschinerie, die Stimulus-abhängige Chemotaxis entlang von Gradienten ermöglicht. Verschiedene Habitate führen in Mikroorganismen zu einer spezifischen Anpassung der Flagellensysteme, was zu einer hohen Variabilität der Charakteristika von Flagellensystemen unterschiedlicher Organismen führt. Manche Bakterien besitzen neben dem primären, meist polaren, Flagellensystem auch sekundäre laterale Flagellen, die eine Fortbewegung unter Bedingungen ermöglichen, welche die Funktion der polaren Flagelle einschränken können. So gewährleisten diese zum Beispiel die Fortbewegung in Umgebungen mit hoher Viskosität oder das Schwärmen von Zellen über Oberflächen. Die Produktion des kostspieligen zweiten Flagellensystems unterliegt dabei einer strikten regulatorischen Kontrolle.

Shewanella putrefaciens CN-32 besitzt, neben einer Na⁺-getriebenen polaren Flagelle, ebenfalls ein sekundäres H⁺-getriebenes Flagellensystem, das Ähnlichkeit zu lateralen Flagellensystemen anderer Organismen aufweist. Erstaunlicherweise produziert eine Subpopulation in *S. putrefaciens* CN-32 ein bis zwei laterale, zufällig lokalisierende Flagellen bereits während des exponentiellen Wachstums in planktonischer Kultur. Phänotypische und fluoreszenzmikroskopische Analysen demonstrierten, dass beide Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 auf struktureller Ebene hochspezifisch sind. Ein Chemotaxissystem induziert spezifisch den Richtungswechsel der bidirektional rotierenden polaren Flagelle, aber nicht den der unidirektional drehenden lateralen Flagelle. Die Rotation der polaren Flagelle ist ausreichend, um maximale Schwimmgeschwindigkeit in planktonischer Kultur zu erreichen. Dennoch zeigen Zellen, die ein bis zwei zusätzliche laterale Flagellen besitzen, eine effektivere, gerichtete Schwimmbewegung, die vermutlich mit der effizienten Neuorientierung der Zellkörper einhergeht. Eine solche Eigenschaft für ein laterales Flagellensystem wurde bisher noch nicht beschrieben und könnte daher ein neuartiges System zur erfolgreichen Exploration neuer Habitate darstellen. Die Präsenz von dualen Flagellensystemen in einer Vielzahl von aquatisch vorkommenden Bakterien ist ein Indiz für ähnliche Funktionsweisen der Flagellensysteme in anderen Organismen.

Im Gegensatz zu *S. putrefaciens* CN-32 nutzt *Shewanella oneidensis* MR-1 nur eine einzelne polare Flagelle mit einem dualen Statorsystem, um sich bei unterschiedlichen Natriumkonzentrationen fortbewegen zu können. Das Flagellenfilament besteht aus den homologen Flagellinen FlaA und FlaB, deren posttranslationale Modifizierung essentiell für die Assemblierung der Flagelle ist. MS-Untersuchungen, sowie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Genort-spezifische Mutationen zeigten, dass FlaA und FlaB an mindestens vier Serinen über O-glykosidische Bindungen modifiziert werden. Detaillierte Analysen der Modifizierung wiesen darauf hin, dass diese sich aus einem Pseudaminsäure-Derivat (Pse) und einer strukturell unbekannten, 264 Da schweren Einheit zusammensetzt. Partiiell konservierte Gene innerhalb der Modifizierungsregion neben variablen Bereichen, wie z.B. dem *sfmABCDE*-Operon, lassen einen allgemeinen Mechanismus der Flagellin-Glykosylierung mit Spezies-spezifischen Zucker-Resten in anderen *Shewanella*-Vertretern vermuten.

Meine Ergebnisse zeigen, dass ein synchron funktionierendes duales Flagellensystem in *S. putrefaciens* CN-32 effektives gerichtetes Schwimmverhalten vermitteln kann und demonstrieren die essentielle Bedeutung der Glykosylierung von Flagellin mit Pse für die Motilität von *S. oneidensis* MR-1. Die Erkenntnisse dieser Arbeit erweitern das Wissen über Flagellen-vermittelte Fortbewegung in Bakterien und verdeutlichen die Komplexität und Variabilität der Flagellensysteme in Bezug auf die evolutionäre Anpassung homologer Proteinkomplexe und regulatorischer Netzwerke an die Umwelt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	15
1 Einleitung	16
1.1 Die bakterielle Flagelle	16
1.1.1 Die Struktur der bakteriellen Flagelle.....	16
1.1.2 Funktion von Flagellen	20
1.1.3 Regulation und Assemblierung der bakteriellen Flagelle.....	21
1.1.4 Rotor und Motor der Flagelle: „Switch-Complex“ und Statorkomplexe.....	23
1.1.5 Filament und Haken.....	27
1.1.6 Posttranslationale Modifikation der Flagelline	28
1.2 Chemotaxis	29
1.2.1 Sensitive Sensoren: Methyl-akzeptierende-Chemotaxis-Proteine	29
1.2.2 Reizweiterleitung und Regulation der Bewegung im Chemotaxissystem von <i>E. coli</i>	30
1.3 Vielfalt und Physiologie der Flagellensysteme	31
1.3.1 Polare und peritriche Flagellensysteme.....	32
1.3.2 Duale Flagellensysteme.....	33
1.4 Der Genus <i>Shewanella</i>.....	37
1.4.1 Stoffwechselphysiologie.....	39
1.4.2 Motilität von <i>Shewanella</i>	39
1.5 Zielsetzung	42
2 Ergebnisse	44
2.1 <i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32 besitzt ein duales Flagellensystem.....	44
2.1.1 Zwei Gencluster für ein putativ duales Flagellensystem in <i>S. putrefaciens</i> CN-32	44
2.1.2 Gene beider Flagellensysteme werden zeitgleich exprimiert	46
2.1.3 Präsenz eines dualen Flagellensystems	48
2.1.4 Einfluss der Flagellensysteme auf die Motilität	49
2.2 Lokalisation und Spezifität der Flagellensysteme	51
2.2.1 Die Spezifität des C-Ring Proteins FlhM	52
2.2.2 Die Spezifität der Motorkomponenten	54
2.2.3 Regulatorische Interaktion der Flagellensysteme	55
2.3 Nutzen und Funktion eines dualen Flagellensystems in <i>S. putrefaciens</i> CN-32	56
2.3.1 Das Chemotaxissystem von <i>S. putrefaciens</i> CN-32	58
2.3.2 Lokalisation und Spezifität des Chemotaxissystems	59
2.3.3 Der Einfluss von Heterogenität auf effektives Schwimmverhalten	65
2.4 Eigenschaften und Charakteristika des Flagellenfilaments in <i>S. oneidensis</i> MR-1	68
2.4.1 Die Flagelline FlaA und FlaB von <i>S. oneidensis</i> MR-1	70
2.4.2 Die posttranslationale Modifizierung der Flagelline	73
2.4.3 Die strukturelle Analyse der Modifizierung	76
3 Diskussion	79
3.1 Glykosylierung des Flagellenfilaments von <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	79
3.1.1 Funktion der Flagelline FlaA und FlaB	80
3.1.2 Funktion einer konservierten Genregion in der posttranslationalen Modifizierung der Flagelline in <i>Shewanella</i> spp.	80
3.1.3 Die Modifizierung von FlaA und FlaB.....	82

3.2 Ein duales Flagellensystem in <i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32.....	85
3.2.1 Ursprung eines dualen Flagellensystems in <i>Shewanella</i> spp.....	86
3.2.2 Die Spezifität und Regulation eines dualen synchron funktionierenden Flagellensystems	87
3.2.3 Die Rolle der Heterogenität in der Population von <i>S. putrefaciens</i> CN-32.....	90
3.2.4 Wirkung und Funktion eines spezifischen Chemotaxissystems in <i>S. putrefaciens</i> CN-32	91
3.2.5 Funktion eines dualen Flagellensystems in <i>S. putrefaciens</i> CN-32.....	94
3.2.6 Ausblick: Wie wird die Funktionalität dieses Flagellensystems gewährleistet?	98
4 Material und Methoden.....	100
4.1 Chemikalien und Materialien.....	100
4.1.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	100
4.1.2 Oligonukleotide	103
4.1.3 Nährmedien	108
4.1.4 Antibiotika und Medienzusätze.....	109
4.1.5 Enzyme.....	109
4.1.6 Kits	110
4.1.7 Puffer	110
4.1.8 Geräte.....	111
4.2 Methoden	111
4.2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen	111
4.2.2 Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme.....	112
4.2.3 Konstruktion von transkriptionellen <i>lux</i> -Reporterfusionsproteinen.....	113
4.2.4 Konstruktion von Fluoreszenzprotein-Fusionen	113
4.2.5 Analyse der Expressionseffizienz mittels des <i>lux</i> -basierten Reportersystems.....	114
4.2.6 Lebendfluoreszenzmarkierung von <i>S. putrefaciens</i> CN-32.....	114
4.2.7 Motilitäts-Assays.....	114
4.2.8 Flagellenfärbung	115
4.2.9 Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	115
4.2.10 Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine	116
4.2.11 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	116
4.2.12 Herstellung spezifischer Antikörper	117
4.2.13 Western-Blot Analysen	117
4.2.14 Aufreinigung von Flagellenfilamenten	117
4.2.15 Konkurrenzversuche mit lebendfluoreszenzmarkierten Zellen.....	118
5 Quellenverzeichnis	120
6 Appendix	133
Danksagung	138
Lebenslauf.....	139

Abkürzungsverzeichnis

(M/k)Bp	<u>M</u> ega-/ <u>k</u> ilo-Basenpaare
CCW	gegen den Uhrzeigersinn (<i>counter clock<u>wise</u></i>)
Cfp	Cyan-fluoreszierendes Protein
CMP	Cytosinmonophosphat
CW	im Uhrzeigersinn (<i>clock<u>wise</u></i>)
Da	Dalton (Maßeinheit)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GOF	konstitutiv aktiv (<i>gain of function</i>)
h	Stunde(n)
k	Kilo
LOF	inaktiv (<i>loss of function</i>)
mCherry	Rot-fluoreszierendes Protein (<i>monomeric <u>C</u>herry</i>)
min	Minute(n)
OD	optische Dichte
Pa	Pascal (Einheit für Partialdruck)
s	Sekunde(n)
sfGfp	Grün-fluoreszierendes Protein (<i>superfolder green fluorescent <u>p</u>rotein</i>)
T3S	Typ III Sekretionsapparat
UDP	Uridindiphosphat
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
üT	über Tag
v/v	Volumen pro Volumen (<i><u>v</u>olume per <u>v</u>olume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i><u>w</u>eight per <u>v</u>olume</i>)
Yfp	Gelb-fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent <u>p</u>rotein</i>)

1 Einleitung

Aktive Bewegung ist eine entscheidende evolutionäre Anpassung, die es Organismen ermöglicht sich effizient und gerichtet auf eine stets im Wandel begriffene Umwelt zu reagieren oder aktiv diesen Wandel mit zu gestalten. Neben einer enormen Vielfalt an Fortbewegungstechniken bei Eukaryoten, haben auch Bakterien und Archaeen elegante Strategien zur effizienten Fortbewegung ausgebildet. Es gibt schwimmende, schwärmende, gleitende, kriechende und „schwebende“ Fortbewegungsformen [136]. *Mycoplasma* hat sogar eine Bein-ähnliche Struktur entwickelt, mit der dieses interessante Bakterium über Oberflächen „laufen“ kann [236]. Prokaryoten, die sich besonders schnell und effizient bewegen, nutzen jedoch ein rotierendes Proteinfilament, die bakterielle Flagelle. Die bakteriellen Spitzenreiter in der Flagellenrotation lassen dabei ihre Flagellen mit erstaunlichen 100.000 Umdrehungen pro Minute rotieren [215]. Die Bakterien, die Flagellen als Fortbewegungsmittel nutzen, übertrumpfen uns – gerade was die Geschwindigkeit angeht – bei Weitem. So gibt es Bakterien, die in einer Sekunde das 200-fache ihrer eigenen Körperlänge zurücklegen können [81]. In erster Linie ermöglicht die Flagellenvermittelte Bewegung den Bakterien jedoch die aktive und gerichtete Bewegung hin zu günstigeren – oder weg von ungünstigen – Bedingungen, die auf sie einwirken [11, 134].

1.1 Die bakterielle Flagelle

Die bakterielle Flagelle ist eine komplexe, enorm effiziente und elegante Nano-Maschine, mit deren Hilfe sich Bakterien in mehrfacher Hinsicht fortbewegen können. So gibt es Flagellensysteme, die in erster Linie zur Fortbewegung in flüssiger Umgebung gedacht sind, während andere Flagellensysteme zudem – oder ausschließlich – dem Zweck dienen, in viskoser Umgebung, oder auf Oberflächen Motilität zu vermitteln [107, 108]. Allerdings spielt der Flagellenapparat nicht nur bei der Fortbewegung eine wichtige Rolle, sondern ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung, wenn Mikroorganismen von einem planktonischen zu einem sessilen, persistenten Lebensstil – dem sogenannten Biofilm [56] – übergehen [281], und ist nicht zuletzt deswegen ein wichtiger Virulenzfaktor [142, 260]. Faszinierend ist, dass Bakterien ihre Flagellen auch als eine Art Mechano- und als einen Feuchtigkeitssensor verwenden können [219, 385].

1.1.1 Die Struktur der bakteriellen Flagelle

Hinter der komplexen Nanomachine verbirgt sich eine einfache Grundstruktur, die im Wesentlichen aus einem beweglichen und einem statischen Teil besteht. Der bewegliche Teil setzt sich dabei aus dem prominentesten Teil – dem Filament – und dem sich in der Zellmembran befindlichen Basalkörper – dem Rotor – zusammen, die durch ein universelles Verbindungsstück – dem Haken – verbunden sind, während der statische Teil durch die fest an der Peptidoglykanschicht verankerten Statorkomplexe – die Motorproteine – gebildet wird (Abb. 1). Insgesamt ist beispielsweise bei *Salmonella enterica* serovar Typhimurium die Transkription von etwa

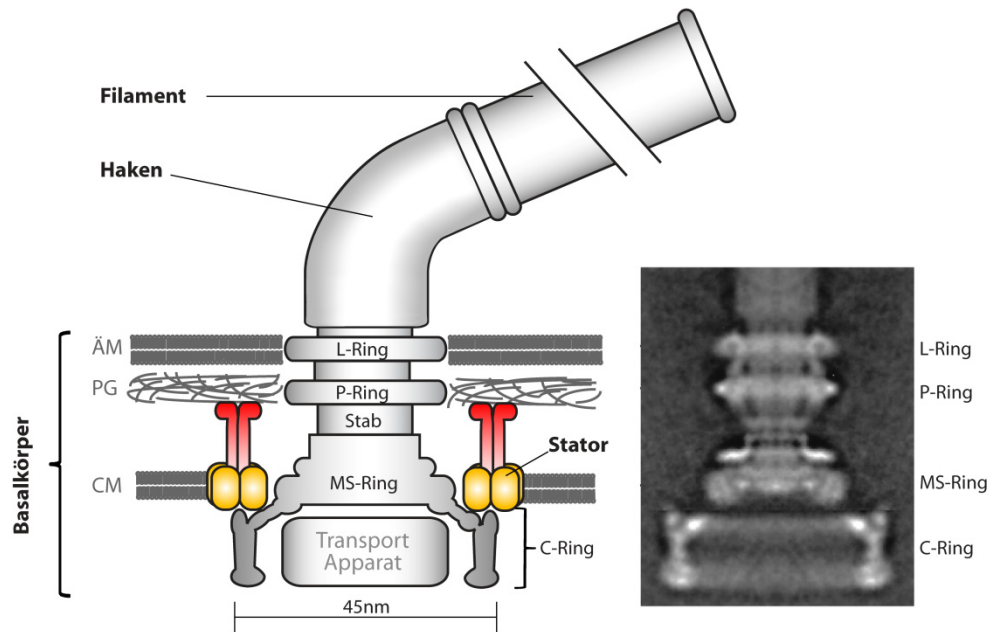


Abb. 1: Struktur der bakteriellen Flagelle.

Links: Die schematische Ansicht zeigt den Aufbau der Flagelle. Der bewegliche Teil der Flagelle ist in grau gehalten, der statische Teil ist farbig dargestellt. Der C- und MS-Ring befinden sich in der Cytoplasmamembran (CM), der P-Ring in der Peptidoglykanschicht (PG), während der L-Ring sich in der äußeren Membran (ÄM) befindet. Der Haken ist mit dem Basalkörper über den Stab und am äußeren Ende mit dem Filament verbunden und dient so als universelles und flexibles Verbindungsstück. Das Flagellenfilament (hier verkürzt dargestellt) kann mehrere Mikrometer lang sein und ist aus bis zu 20.000 Flagellin-Untereinheiten aufgebaut. Die A-Untereinheit (gelb) der Statoren befindet sich in der Cytoplasmamembran, die B-Untereinheit überbrückt den periplasmatischen Raum und ist am Peptidoglykan verankert. Mittels Gradienten von H^+ -Ionen oder Na^+ -Ionen können die Statoren kinetische Energie erzeugen und auf den Rotor übertragen. Das erzeugte Drehmoment wird vom Rotor über den Haken auf das Filament übertragen. (Abbildung modifiziert nach [358]). **Rechts:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Basalkörpers durch rotationsgemittelte Rekonstruktion mehrerer elektronenmikroskopischer Aufnahmen von aufgereinigten Flagellenbasalkörpern aus *Escherichia coli*. Der Statorkomplex fehlt, da dieser bei der Aufreinigung verloren geht (adaptiert von [25]).

50 verschiedenen Genen notwendig, um eine vollständige, funktionsfähige Flagelle zu assemblieren, wovon 21 offene Leserahmen allein für Strukturproteine codieren [21]. Eine Liste der einzelnen Komponenten für die Flagellensynthese ist in Tabelle 1 zu finden.

Das helikale Filament der bakteriellen Flagelle wird in manchen Organismen aus einer einzigen Untereinheit – dem Flagellin – gebildet, andere Organismen dagegen besitzen mehrere verschiedene Flagelline, um das Filament aufzubauen [77, 187]. Die Flagelline werden dabei durch den Exportapparat und das an der Spitze wachsende Flagellenfilament transportiert und dort mit Hilfe von FliD assembliert. Manche Organismen bilden eine Art Membranausstülpung, welche die Flagelle komplett umschließt [327]. In jedem Fall besitzt das Filament eine halbstarre helikale Form, die für die „Propeller“-Funktion von entscheidender Wichtigkeit ist [295]. Der Haken besitzt ebenfalls eine helikale Form, ist jedoch wesentlich kürzer und auch flexibler [296]. Dieses universelle und flexible Verbindungsstück verbindet den Basalkörper und das Filament, wobei diese

Tabelle 1: Gene des polaren und lateralen Flagellensystems und der Chemotaxiskomponenten von *Vibrio parahaemolyticus*. Adaptiert von und modifiziert nach [225, 282, 394].

Gen-Nomenklatur	annotierte Funktion des Proteins	Lokalisation	Klasse
Gene für polare Flagellen (Chromosom 1: Region 1, Region 2)			
<i>flgT</i>	H-Ring, Basalkörperprotein, Interaktion mit MotY	äußere Membran	?
<i>flgN</i>	FlgK und FlgL spezifisches Chaperon	cytoplasmatisch	IV
<i>flgM</i>	Anti-Sigma ²⁸ -Faktor	cytoplasmatisch	IV
<i>flgA</i>	P-Ring Chaperon	cytoplasmatisch	unabh.
<i>cheR</i>	Chemotaxis Methylase, methyliert MCPs	cytoplasmatisch	?
<i>cheV</i>	CheW/CheY Hybridprotein, moduliert CheA Signaltransduktion	cytoplasmatisch	?
<i>flgB</i>	Stabprotein (innen)	periplasmatisch	III
<i>flgC</i>	Stabprotein (innen)	periplasmatisch	III
<i>flgD</i>	Hakenprotein („Verschlussprotein“)	extrazellulär	III
<i>flgE</i>	Hakenprotein (Hauptbestandteil des Hakens)	extrazellulär	III
<i>flgF</i>	Stabprotein (innen)	periplasmatisch	III
<i>flgG</i>	Stabprotein (außen)	periplasmatisch	III
<i>flgH</i>	L-Ring (Lipopolysaccharidschicht)	äußere Membran	III
<i>flgI</i>	P-Ring (Peptidoglykan)	periplasmatisch	III
<i>flgJ</i>	Peptidoglykan Hydrolase	periplasmatisch	III
<i>flgK</i>	HAP1 (Verbindungsprotein zwischen Haken und Filament), zum Haken verbunden	extrazellulär	III
<i>flgL</i>	HAP3 (Verbindungsprotein zwischen Haken und Filament), zum Filament verbunden	extrazellulär	III
<i>flaC</i>	Flagellin, Filamentuntereinheit	extrazellulär	IV
<i>flaD</i>	Flagellin, Filamentuntereinheit	extrazellulär	IV
<i>flaE</i>	Flagellin, Filamentuntereinheit	extrazellulär	IV
<i>flaF</i>	Flagellin, Filamentuntereinheit	extrazellulär	IV
<i>flaB</i>	Flagellin, Filamentuntereinheit	extrazellulär	IV
<i>flaA</i>	Flagellin, Filamentuntereinheit	extrazellulär	III
<i>flaG</i>	Regulator der Filamentlänge	?	III
<i>fliD</i>	HAP2, Kappenprotein des Filaments	extrazellulär	III
<i>fliI</i>	unbekannt	?	III
<i>fliS</i>	Flagellin-spezifisches Chaperon	cytoplasmatisch	III
<i>flaK</i>	Sigma ⁵⁴ -abhängiger Transkriptionsregulator	cytoplasmatisch	I
<i>flaL</i>	PAS-PAC Zwei-Komponenten Signaltransduktions Sensor-Histidinkinase	cytoplasmatisch	II
<i>flaM</i>	Zwei-Komponenten Signal Transduktions Antwortregulator, Sigma ⁵⁴ -abhängiger Transkriptionsregulator,	cytoplasmatisch	II
<i>fliE</i>	Basalkörperprotein, Verbindung zwischen MS-Ring und Stab	periplasmatisch	II
<i>fliF</i>	MS-Ring Protein (Cytoplasmamembran und Supramembranös)	innere Membran	II
<i>fliG</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, Rotor-Stator Interaktion	cytoplasmatisch / Membraninnenseite	II
<i>fliH</i>	Flagellenexport-Protein, negativer Regulator von FliI	cytoplasmatisch	II
<i>fliI</i>	ATPase des Flagellenexports	cytoplasmatisch	II
<i>fliJ</i>	Flagellenexport	cytoplasmatisch	II
<i>fliK</i>	Kontrollprotein für Hakenlänge	extrazellulär	III
<i>fliL</i>	Basalkörperprotein	?	III
<i>fliM</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, CheY-Interaktion	cytoplasmatisch / Membraninnenseite	III
<i>fliN</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, CheY-Interaktion	cytoplasmatisch / Membraninnenseite	III
<i>fliO</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion	innerhalb MS-Ring	III
<i>fliP</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion	innerhalb MS-Ring	III
<i>fliQ</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion	innerhalb MS-Ring	III
<i>fliR</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion	innerhalb MS-Ring	unabh.
<i>fliB</i>	Flagellenexport, Interaktion mit FliH-J	innerhalb MS-Ring	II
<i>fliA</i>	Flagellenexport, Interaktion mit FliH-J, Initiatorprotein der Flagellenassemblierung in <i>E. coli</i> [190]	innerhalb MS-Ring	II
<i>fliF</i>	GTP-bindendes Protein, Regulator der Flagellenlokalisierung am Pol	innere Membran	II
<i>fliG</i>	ATPase, Regulator der Flagellensynthese (Anzahl der Flagellen),	cytoplasmatisch	II
<i>fliA</i>	RNA-Polymerase Sigma ²⁸ -Faktor	cytoplasmatisch	II
<i>cheY</i>	Chemotaxis Antwortregulator, induziert Richtungsänderung der, Flagellendrehung, Interaktion mit FliMN	cytoplasmatisch	II
<i>cheZ</i>	CheY-spezifische Phosphatase	cytoplasmatisch	II
<i>cheA</i>	Chemotaxis Histidinkinase	cytoplasmatisch	II
<i>cheB</i>	Chemotaxis Methylsterase, demethyliert MCPs	cytoplasmatisch	II
<i>VP2227</i>	ATPase Domäne, Soj		

Gen-Nomenklatur	annotierte Funktion des Proteins	Lokalisation	Klasse
VP2226	unbekannt		
cheW	Chemotaxis Kupplungsprotein, verbindet MCPs und CheA	cytoplasmatisch	II
VP2224	unbekannt		
pomA	Untereinheit des Na ⁺ -Ionen abhängigen Stators, übt Drehmoment gegenüber dem Rotor aus	innere Membran	IV
pomB	Untereinheit des Na ⁺ -Ionen abhängigen Stators, am Peptidoglykan verankert, wandelt Na ⁺ -Ionenfluss in Energie um	innere Membran / periplasmatisch	IV
motY	T-Ring, Bestandteil des Na ⁺ -Ionen abhängigen Motors	periplasmatisch	III
motX	T-Ring, Bestandteil des Na ⁺ -Ionen abhängigen Motors	periplasmatisch	IV
Gene für laterale Flagellen (Chromosom 2: <u>Region 1</u>, <u>Region 2</u>)			
flgN	FlgK und FlgL spezifisches Chaperon	cytoplasmatisch	II
flgM	Anti-Sigma ²⁸ -Faktor	cytoplasmatisch	II
flaA	P-Ring Chaperon	cytoplasmatisch	II
flaB	Stabprotein (innen)	periplasmatisch	II
flaC	Stabprotein (innen)	periplasmatisch	II
flaD	Hakenprotein („Verschlussprotein“)	extrazellulär	II
flaE	Hakenprotein (Hauptbestandteil des Hakens)	extrazellulär	II
flaF	Stabprotein (innen)	periplasmatisch	II
flaG	Stabprotein (außen)	periplasmatisch	II
flaH	L-Ring (Lipopolysaccharidschicht)	äußere Membran	II
flaI	P-Ring (Peptidoglykan)	periplasmatisch	II
flaJ	Peptidoglykan Hydrolase	periplasmatisch	II
flaK	HAP1 (Verbindungsprotein zwischen Haken und Filament), zum Haken verbunden	extrazellulär	III
flaL	HAP3 (Verbindungsprotein zwischen Haken und Filament), zum Filament verbunden	extrazellulär	III
flgU	unbekannt, aber essentiell	?	?
fliJ	Flagellenexport	cytoplasmatisch	II
fliI	ATPase des Flagellenexports	cytoplasmatisch	II
fliH	Flagellenexport-Protein, negativer Regulator von FliI	cytoplasmatisch	II
fliG	C-Ring Protein, Teil des „Switch-Complex“ (Cytoplasmatischer Ring), Rotor-Stator Interaktion	cytoplasmatisch / Membraninnenseite	II
fliF	MS-Ring Protein (Cytoplasmamembran und Supramembranös)	innere Membran	II
fliE	Basalkörperprotein, Verbindung zwischen MS-Ring und Stab	periplasmatisch	II
lafK	Sigma ⁵⁴ -abhängiger Transkriptionsregulator	cytoplasmatisch	I
motY	T-Ring, Bestandteil des H ⁺ -Ionen abhängigen Motors	periplasmatisch	II
fliM	C-Ring Protein, Teil des „Switch-Complex“ (Cytoplasmatischer Ring), CheY-Interaktion	cytoplasmatisch / Membraninnenseite	?
fliN	C-Ring Protein, Teil des „Switch-Complex“ (Cytoplasmatischer Ring), CheY-Interaktion	cytoplasmatisch / Membraninnenseite	?
fliP	Flagellenexport Typ III-Sekretion	innerhalb MS-Ring	?
fliQ	Flagellenexport Typ III-Sekretion	innerhalb MS-Ring	?
fliR	Flagellenexport Typ III-Sekretion	innerhalb MS-Ring	?
fliB	Flagellenexport, Interaktion mit FliH-J	innerhalb MS-Ring	?
fliA	Flagellenexport, Interaktion mit FliH-J, Initiatorprotein der Flagellenassemblierung in <i>E. coli</i> [190]	innerhalb MS-Ring	?
VPA1547	unbekannt	?	?
lafA	Flagellin, Filamentuntereinheit	extrazellulär	III
VPA1549	unbekannt	?	?
fliD	HAP2, Kappenprotein des Filaments	extrazellulär	III
fliS	Flagellin-spezifisches Chaperon	cytoplasmatisch	III
fliT	Chaperon	cytoplasmatisch	III
fliK	Kontrollprotein für Hakenlänge	extrazellulär	III
fliL	Basalkörperprotein	?	III
fliA	RNA-Polymerase Sigma ²⁸ -Faktor	cytoplasmatisch	III
motA	Untereinheit des H ⁺ -Ionen abhängigen Stators, übt Drehmoment gegenüber dem Rotor aus	innere Membran	III
motB	Untereinheit des H ⁺ -Ionen abhängigen Stators, am Peptidoglykan verankert, wandelt H ⁺ -Ionenfluss in Energie um	innere Membran / periplasmatisch	III

spezielle Struktur vermutlich erst ermöglicht, dass sich mehrere Flagellen in synchroner Rotation zu einem kohärent rotierenden Bündel verbinden können. Die verschiedenen Ringe des Basalkörpers sind in Bezug auf ihre Lokalisation in der Membran benannt worden: L-Ring, Lipopolysaccharidschicht; P-Ring, Peptidoglykan; MS-Ring, Cytoplasmamembran und Supramembranös; C-Ring, Cytosol [2, 66, 82, 150].

1.1.2 Funktion von Flagellen

Die wichtigste Funktion der Flagelle ist es Bakterien unter verschiedenen Bedingungen und auf sehr effiziente Weise fortzubewegen. Die Energie elektrochemischer Ionengradienten – entweder H^+ -Ionen oder Na^+ -Ionen – über die innere Membran können durch die Statoren direkt an den beweglichen Teil der Flagelle weitergegeben werden, wodurch Drehmoment und schlussendlich eine rotierende Flagelle erzeugt wird. Durch die halbfeste, helikale Struktur des Filaments ähnelt die bakterielle Flagelle in der Funktionsweise einem Propeller, der durch Rotation in beide Richtungen entweder Schub oder Zug erzeugen kann. Die Funktion der Flagelle beschränkt sich allerdings nicht auf die Vermittlung von Motilität. So kann die Flagelle vieler pathogener Organismen eine entscheidende Rolle sowohl für die Anheftung an, als auch das Eindringen in Epithelzellen spielen [100, 216, 291, 293]. *Campylobacter jejuni* kann mittels des flagellenspezifischen Sekretionsapparates Virulenzfaktoren sekretieren und dadurch beispielsweise an Wirtszellen binden und in diese eindringen [168, 277, 331]. Manche obligaten Symbionten von Insekten, so zum Beispiel *Buchnera aphidicola*, haben viele strukturellen Gene der Flagellensynthese verloren, nutzen jedoch den verbliebenen Sekretionsmechanismus der Flagelle, um bakterielle Proteine in Wirtszellen zu schleusen [213, 320, 362]. Auch für die Biofilmbildung von Bakterien spielen Flagellen unzweifelhaft eine große Rolle. So agieren Flagellen in *Aeromonas* spp. als Adhäsine und stellen einen Oberflächenkontakt her, was nachfolgend zum Übergang von einem planktonischen zu einem sessilen Lebensstil führen kann [159]. In anderen Organismen sind Flagellen mitunter auf andere Art und Weise in die Biofilmbildung involviert. So fungiert das Protein EpsE in *Bacillus subtilis* auf der einen Seite als molekulare Kupplung, um die Flagellenrotation zu stoppen und somit einen sessilen Lebensstil des Bakteriums zu ermöglichen, und auf der anderen Seite auch als essentielles Protein für die Produktion von Exopolysacchariden, die eine wichtige Rolle in der extrazellulären Matrix übernehmen, in die biofilmassoziierte Zellen eingebettet sind [30, 103]. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium kann über die Flagellen Umweltbedingungen wahrnehmen – in diesem Falle die Umgebungsfeuchtigkeit [385]. Wenn die Umgebung zu trocken ist, können Flagellinuntereinheiten am Ende des Filaments nicht mehr polymerisieren und somit das Filament „verstopfen“, was wiederum zu einem verringerten Export von FlgM führt (für genauere Details zur Regulation der Flagellensynthese in *Salmonella*, siehe: 1.1.3 Regulation des Flagellenaufbaus: Das *Salmonella* Paradigma). Somit werden späte Flagellengene transkriptionell reprimiert, was unter anderem mit dem Chemotaxisystem dieses Organismus zusammenhängt [385]. In *Vibrio cholerae* hat die Flagelle eine mechanosensorische Funktion, die sich dergestalt auswirkt, dass die Flagellenrotation eingeschränkt oder gestoppt wird, wenn die Zellen an eine Oberfläche adhären. Dadurch vollzieht sich ein transienter Anstieg des Membranpotentials ($\Delta\Psi$), was einen Übergang zu einem permanent sessilen Lebensstil initiieren könnte [374].

1.1.3 Regulation und Assemblierung der bakteriellen Flagelle

Die Assemblierung und das Betreiben der bakteriellen Flagelle ist eine kostspielige Investition von Ressourcen und unterliegt daher einer strikten Regulation. Diese ermöglicht den Organismen entweder Ressourcen zu sparen, oder auf Fortbewegung umzustellen. Die Regulation des Flagellenaufbaus macht sich dabei die Fertigstellung von Intermediärstadien des Flagellenapparates zunutze, die als Kontrollpunkte der koordinierten Flagellensynthese dienen. Die zwei großen Kontrollpunkte sind dabei erstens, die Fertigstellung der Ring-Komponenten und des Typ III Sekretionsapparates (T3S), und zweitens, die Fertigstellung des Basalkörperkomplexes und des Hakens. Das erste Protein, das in die Cytoplasmamembran eingebaut wird, ist FlhA [190], gefolgt von der Assemblierung des MS-Rings (FliF). Der MS-Ring agiert als Grundstein für den Flagellenapparat und akquiriert als nächstes FliG, FliM und FliN, um den C-Ring fertig zu stellen. Gleichzeitig wird auch der T3S vollendet, um alle weiteren Komponenten für die Flagellenstruktur aus dem Cytoplasma an die Spitze der wachsenden Struktur zu transportieren [3]. Als erste nicht-cytoplasmatische Struktur überbrückt der Stab das Periplasma und die äußere Membran der Gramnegativen, bzw. die Zellwand der Grampositiven Bakterien [261]. *Caulobacter crescentus*, *Vibrio* spp. und *Pseudomonas* spp. nutzen die Initiierung der Stab-Assemblierung als eingeschobenen Kontrollpunkt [59, 224, 243]. Die Fertigstellung des Stabes ist gefolgt von der Assemblierung des Hakens an der Spitze des Stabes. Die Beendigung der Assemblierung des Haken-Basalkörper-Komplexes ist, wie zuvor erwähnt, auch der nächste Kontrollpunkt der Flagellensynthese [121, 175]. Das T3S-Exportprotein FlhB durchläuft eine Selbstspaltung in der C-terminalen, cytoplasmatischen Domäne und interagiert darauf folgend mit FliK – dem Kontrollprotein für die Länge des Hakens –, was eine Änderung der Substratspezifität des T3S von Basalkörper- zu Filament-spezifischen Komponenten der Flagelle bewirkt [233, 234, 396]. Mit der Fertigstellung des Hakens assemblieren die hakenassoziierten Proteine FlgK und FlgL an der Spitze des Hakens, um dort das Verbindungssegment zwischen Haken und Filament zu bilden. FliD dient als Dichtungsprotein und stößt gleichzeitig die Polymerisation der Flagellinuntereinheiten zum Filament an, wobei FliD stets am äußersten Ende des Filaments verbleibt [406]. In *E. coli* oder *Salmonella* erreicht das Filament im Durchschnitt eine Länge von etwa 7 μm und besteht aus bis zu 20.000 Flagellineinheiten [295]. Das Filament kann auch deutlich länger werden, so wurden sowohl in *E. coli*, als auch in *Salmonella* Filamentlängen von bis zu 15 μm beobachtet [58, 406].

Regulation des Flagellenaufbaus: Das *Salmonella* Paradigma

Die Regulation des Flagellensystems in *Salmonella* basiert auf der Präsenz drei verschiedener Promotorklassen, die eine strikte Transkriptionshierarchie markieren (vgl. Abb. 2A). Ein einziger Klasse I Promotor ($P_{\text{Klasse I}}$) induziert spezifisch die Transkription des Flagellenmasterregulators FlhD₄C₂ [13, 175]. Zusammen mit dem Sigmafaktor σ^{70} aktiviert FlhD₄C₂ die Transkription der Klasse II Promotor ($P_{\text{Klasse II}}$)-abhängigen Gene, die zum Einen für strukturelle Komponenten des Basalkörpers, aber zum Anderen auch für zwei weitere Regulationsfaktoren codieren, den Sigmafaktor σ^{28} (auch FliA genannt) und dessen Antagonist, den Anti-Sigmafaktor FlgM [91, 256]. Die dritte und letzte Promotorklasse ($P_{\text{Klasse III}}$), ist strikt von der Verfügbarkeit von σ^{28} abhängig und reguliert die Transkription aller späten Flagellengene, die etwa für die Flagelline, die

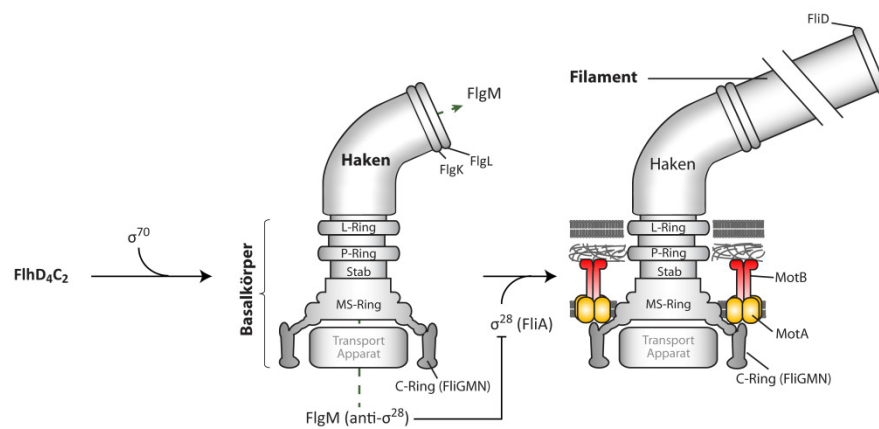
Chemotaxismaschinerie und die Statorkomponenten codieren. Die Regulationskaskade des Flagellenaufbaus in *Salmonella* ist zwar die bislang bestuntersuchte, jedoch steht diese nicht repräsentativ für die meisten Organismen.

Regulation des Flagellenaufbaus mit alternativen Sigmafaktoren

Der große Unterschied zwischen dem *Salmonella* Regulationssystem und anderen Organismen begründet sich in der Verwendung alternativer Sigmafaktoren, σ^{54} zusammen mit σ^{28}

A

Klasse I -----> Klasse II -----> Klasse III



B

Klasse I -----> Klasse II -----> Klasse III -----> Klasse IV

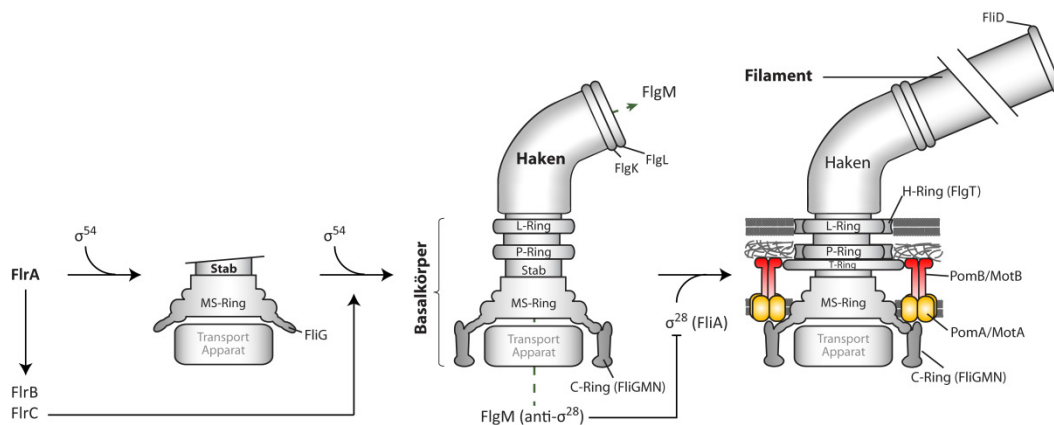


Abb. 2: Zwei Schemata zur Regulation der Flagellenassemblierung.

A Schema der dreiteiligen Regulationskaskade in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (für detaillierte Beschreibung, siehe Text). **B** Die vierstufige, σ^{54} -abhängige Regulationskaskade der Flagellenassemblierung in *Vibrio cholerae* (für detaillierte Beschreibung, siehe Text). Bioinformatische Analysen lassen vermuten, dass in *Shewanella* spp. die σ^{54} -abhängige vierstufige Regulationskaskade vorherrscht. Adaptiert von [10, 394].

(vgl. Abb. 2B). Gerade Mikroorganismen, wie beispielsweise *Pseudomonas* oder *Vibrio* Spezies, die alternative Sigmafaktoren nutzen, besitzen den zuvor erwähnten Einschub in der Regulationskaskade der Flagellenassemblierung nach der Fertigstellung des Stabes [59, 70, 224]. Eine Ausnahme stellen die α -Proteobakterien, im speziellen *Caulobacter crescentus*, dar, die ausschließlich den Haushalts-Sigmafaktor σ^{73} und den alternativen Sigmafaktor σ^{54} zur Transkription Flagellenrelevanter Gene benötigen [70]. Sie weisen vermutlich nur dann die Präsenz von σ^{28} und FlgM auf, wenn ein zweites Flagellensystem via lateralen Gentransfers akquiriert wurde, wie es beispielsweise in *Rhodobacter sphaeroides* und *Bradyrhizobium japonicum* der Fall ist [144, 276]. Alle weiteren, bisher charakterisierten Flagellensysteme nutzen das Zusammenspiel von FlgM und σ^{28} , wobei in jedem Fall die Aktivität von σ^{28} über den Export von FlgM vermittelt wird. Die Sigmafaktoren σ^{54} und σ^{28} modulieren auf unterschiedliche Weise die Transkription und Regulation von Genen. σ^{54} gehört zu seiner eigenen Familie von Sigmafaktoren, während σ^{28} zur Familie der σ^{70} -Sigmafaktoren gehört [44, 204]. Die der σ^{70} -Familie zugehörigen Sigmafaktoren binden alle die charakteristische -10 und -35 Region der Promotorsequenz, um die RNA-Polymerase zu rekrutieren und demzufolge die Transkription zu ermöglichen. Die σ^{54} -Familie der Sigmafaktoren hingegen binden eine enger zusammen liegende Region – die -12 und -24 Region – der Promotorregion [122]. Ein weiterer, aber entscheidender Unterschied ist jedoch, dass σ^{54} ein Hilfsprotein (EBP, engl.: *enhancer binding protein*) rekrutieren muss, welches seinerseits zwischen 70 und 150 Bp stromaufwärts des Startcodons die DNA bindet, bevor eine Transkription möglich ist [44, 242, 390]. Die Aktivierung der Transkription ist dabei von der ATP-Hydrolyse des EBP – das eine konservierte ATPase-Domäne besitzt – abhängig [44]. Eines der ersten analysierten EBPs, von denen gezeigt wurde, dass sie σ^{54} binden, war NtrC, ein Zwei-Komponentensystem Antwortregulator [241]. Zwei-Komponentensysteme bestehen üblicherweise aus einer Sensor kinase und einem zugehörigen Antwortregulator. Sensor kinasen werden durch intrinsische oder extrinsische Signale stimuliert, was zu einer Autophosphorylierung eines konservierten Histidins führt [118]. Durch einen Transfer der Phosphatgruppe auf ein konserviertes Aspartat in der Empfängerdomäne des Antwortregulators, kann dieser aktiviert werden und agiert – mittels der oft vorhandenen DNA-Bindedomäne (engl.: *helix-turn-helix DNA binding motif*) – als transkriptioneller Regulator [118]. Tatsächlich spielen Zwei-Komponentensysteme eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Regulationskaskade der Flagellensysteme von nicht-enterischen Mikroorganismen. Durch diesen Mechanismus der σ^{54} -abhängigen Transkription und vor allem durch die Einbeziehung von Zwei-Komponentensystemen können diese Bakterien eine sehr strikte Regulation der Flagellensysteme gewährleisten, was sich vermutlich aus der Notwendigkeit effizienter Aktivierung aber auch Deaktivierung der Flagellensysteme in nicht-enterischen Organismen entwickelt hat.

1.1.4 Rotor und Motor der Flagelle: „Switch-Complex“ und Statorkomplexe

Während die komplette Flagellenstruktur aus mehr als 20 Proteinen besteht, sind von diesen in vielen Organismen nur 5 Proteine essentiell, um eine Rotation des Filaments zu erzeugen. Dem Rotor zugehörig sind die C-Ring Proteine FliG, FliM und FliN, die zusammen den sogenannten „Switch-Complex“ (engl.: *switch* = Schalter) bilden [402] (vgl.: Abb. 3), der in seiner

Funktion als Schalter die Richtungsänderung der Flagellendrehung induzieren kann. Der Motor besteht im Wesentlichen aus 2 Untereinheiten: den Membranproteinen MotA und MotB, die gemeinsam die Statorkomplexe bilden [63, 151, 340].

Der „Switch-Complex“

Der „Switch-Complex“ induziert Richtungsänderungen der Flagellendrehung, stellt also den Schalter zwischen der Drehung im Uhrzeigersinn (CW; engl.: *clockwise*) und gegen den Uhrzeigersinn (CCW; engl.: *counterclockwise*) dar, ist aber auch für die Rotation selbst und für die Assemblierung der Flagelle unentbehrlich [402]. FlhG ist vor allem in die Rotation der Flagelle

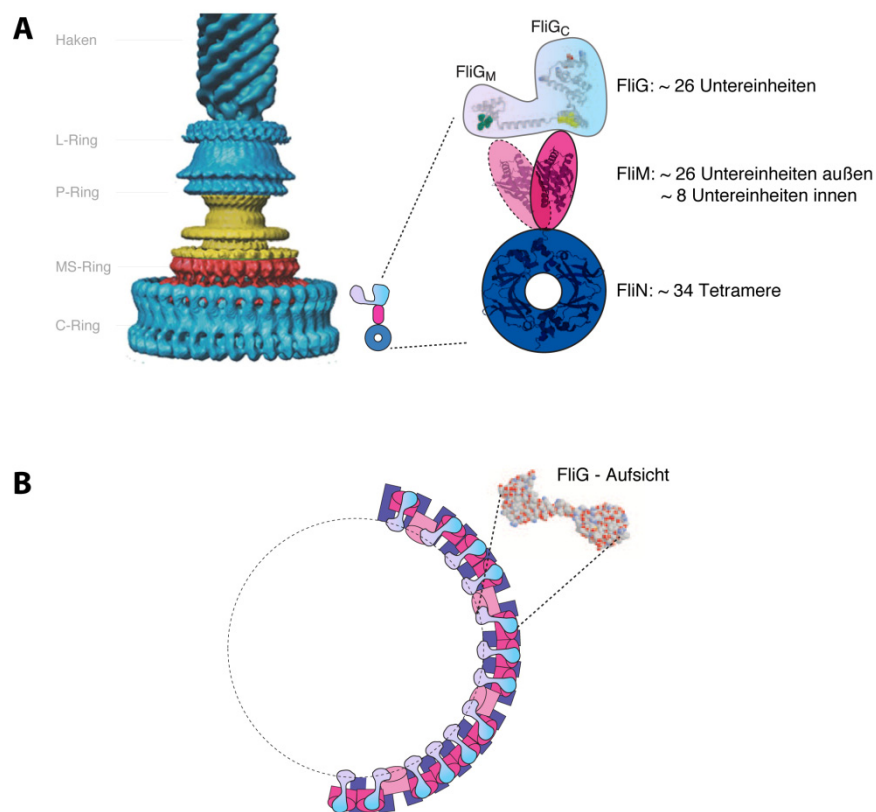


Abb. 3: Der „Switch Complex“.

A Links: 3D *in situ* Rekonstruktion des Flagellenrotors von *S. enterica* serovar Typhimurium mit schematischer Skizze der Positionen von FlhG (FlhG_m=hellviolett – FlhG_c=hellblau), FlhM (innen=hellrot/außen=rot) und FlhN (dunkellila) im C-Ring. **Rechts:** Vergrößertes Schema eines FlhG-FlhM-FlhN Protomers. FlhM existiert in zwei potentiellen Orientierungen: nach innen gerichtet, mit dem EHPQR-Motiv der mittleren Domäne von FlhG (grün) interagierend, oder nach außen gerichtet und mit der hydrophoben Region des C-Terminus (gelb) interagierend. FlhN bildet aus zwei Dimeren eine Ringstruktur. Modifiziert nach [41, 68]. **B** Aufsicht auf das Schema der Anordnung der C-Ring Untereinheiten. Der Farbcode ist identisch mit dem in **A** verwendeten. FlhG interagiert teilweise nur an der C-terminalen Domäne mit den nach außen gerichteten, teilweise zusätzlich an der mittleren Domäne mit den nach innen gerichteten, Untereinheiten von FlhM [206]. Modifiziert nach [41]

involviert und interagiert direkt mit dem Statorprotein MotA [125, 198, 401, 416]. Zudem ist FliG beispielsweise der Interaktionspartner des zuvor erwähnten EpsE Proteins in *B. subtilis* (siehe 1.1.2 Funktion von Flagellen) [30]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FliG das Enzym Fumaratreduktase bindet, was die Notwendigkeit von Fumarat für die Richtungsänderung der Flagellendrehung in *E. coli* erklären könnte [55]. FliM dagegen ist vorwiegend für die Änderung der Drehrichtung der Flagelle verantwortlich [329]. An FliM bindet auch das phosphorylierte Chemotaxisprotein CheY (CheY~P), was wiederum ein Umschalten der Flagellendrehrichtung zur Folge hat, wie es beispielsweise bei *E. coli*, *Salmonella* und *B. subtilis* der Fall ist [88, 184, 364, 387]. In anderen Organismen bewirkt das Binden von CheY~P eine Verlangsamung der Rotationsgeschwindigkeit der Flagelle, was in dem peritrich flagellierten Organismus *Sinorhizobium meliloti*, oder für die lateralen Flagellen von *Vibrio alginolyticus* beobachtet wurde [164, 275]. In *R. sphaeroides* stoppt gebundenes CheY~P – als eine molekulare Bremse – die Flagellendrehung [273]. FliN dagegen spielt vor allem eine wichtige Rolle in der Assemblierung der Flagellen [125, 349, 380], ist jedoch auch für den Richtungswechsel der Flagellendrehung von nicht geringerer Bedeutung [268, 301]. Detailgetreue EM-Rekonstruktionsaufnahmen des „Switch Complex“ konnten die genaue Struktur auflösen (vgl. Abb. 3). FliG befindet sich an der Oberseite und kann somit mit den Statoren und dem MS-Ring interagieren. Darunter lokalisiert FliM, welches sowohl mit der FliG_C als auch FliG_M Domäne interagieren kann. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass FliM in zwei verschiedenen Orientierungen im Rotor vorkommt (vgl. Abb. 3A). Diese beiden Möglichkeiten der Orientierung von FliM könnten zudem der Grund für die unterschiedlichen

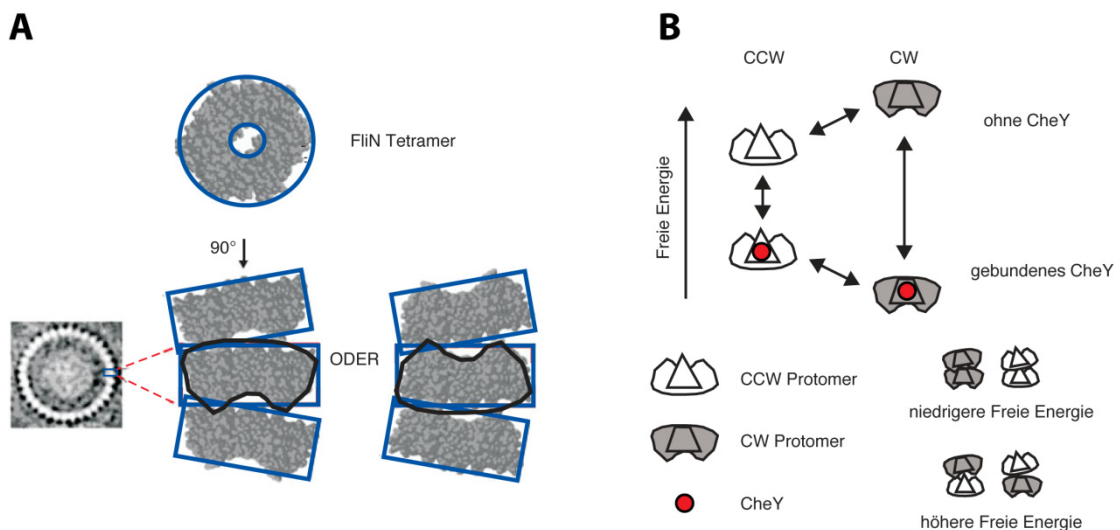


Abb. 4: Strukturelle Eigenschaft von FliN und Modell des Rotationswechsels der Flagelle.

A Röntgenkristallstruktur eines FliN Tetramers und die zwei möglichen Konformationen im C-Ring (links: EM Aufnahme, Aufsicht auf die C-Ring Struktur). **B** Modell für die FliN₄-FliM Protomer Konformations-abhängige Änderung der Flagellendrehrichtung. Die Protomere existieren entweder in der CW oder CCW Konformation, mit oder ohne gebundenes CheY. Gebundenes CheY verringert die freie Energie des jeweiligen Protomers im CW Zustand verglichen mit dem CCW, was die Wahrscheinlichkeit der CW Rotation mit zunehmender Zahl gebundener Protomere erhöht. Nebeneinander vorkommende Protomere mit der gleichen Konformation haben eine niedrigere Energie, als solche mit gegensätzlicher Konformation, was die Wahrscheinlichkeit der kooperativen Richtungsänderung noch verstärkt. Modifiziert nach [337].

Kopienzahlen von FliG (~26) und FliM (~34) im Flagellenrotor sein (vgl. Abb. 3A und B). An der Unterseite befinden sich die FliN Tetramere – aus zwei Dimeren eine Ringform bildend – und interagieren mit einer spezifischen Domäne am C-Terminus von FliM [218, 267, 363]. Es konnte gezeigt werden, dass in und um die hydrophobe Region der Bindestelle wichtige Interaktionsorte für FliH – einem Protein der Export-Maschinerie und somit der Flagellenassemblierung – und auch für CheY~P liegen [97, 228, 268]. Die Funktionsweise des Umschaltens der Flagellendrehrichtung beginnt vermutlich mit der Bindung von CheY~P an die N-terminale Domäne von FliM, die über eine flexible Proteindomäne an das restliche Protein gebunden ist [218] und damit sowohl die Bindung von CheY an FliM erleichtert, als auch die Bindung an die vermutliche CheY-Bindedomäne in FliN ermöglicht. Die ringförmige Struktur des FliN-Tetramers liegt vermutlich in zwei verschiedenen Konformationen vor, die eine leichte Wölbung der Außenränder des FliN-Rings in die eine oder die andere Richtung bedeuten (vgl. Abb. 4A), was die Richtung der Rotation determiniert [75]. Ein Protomer – bestehend aus FliM und einem FliN Tetramer – ‚zeigt‘ dann in Abhängigkeit von gebundenem CheY~P CW oder CCW um den Flagellenrotor, was vermutlich die Rotationsrichtung beeinflusst (vgl. Abb. 4B). Neue Erkenntnisse zeigen, dass sowohl FliM, als auch FliN dynamische Komponenten des C-Rings sind und während der Flagellenrotation ausgetauscht werden können [64, 86]. Für FliM scheint der dynamische Austausch innerhalb des Rotors stark von CheY~P abzuhängen, was Einfluss auf die Rotationsdynamik des Flagellensystems haben könnte [64].

Die Statorkomplexe

Die Statoren sind die eigentlichen Motoren der bakteriellen Flagelle und erzeugen Drehmoment, welches über die Interaktion mit FliG auf den Rotor übertragen wird. Die Energie wird dabei aus Ionengradienten über die Cytoplasmamembran gewonnen [29]. Im Flagellenmotor von *E. coli* existieren mindestens 11 unabhängig voneinander funktionierende Statorkomplexe, die kontinuierlich und dynamisch ausgetauscht werden [180, 287]. Bisher sind zwei verschiedene Statortypen bekannt; die einen – PomA und PomB genannt – werden über Na⁺-, die anderen – MotA und MotB genannt – werden über H⁺-Ionen betrieben [29, 117, 165, 302]. Einzelne Statorkomplexe bestehen im Allgemeinen aus 4 A-Untereinheiten und 2 B-Untereinheiten [35, 302]. Die A-Untereinheit der Statoren hat 4 Transmembrandomänen, ein größeres cytoplasmatisches Segment zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne und ein kleineres periplasmatisches Segment [63, 414, 415]. In MotA gibt es zwei funktionell konservierte Proline innerhalb der dritten und vierten Transmembrandomäne, sowie geladene Reste der Aminosäuren in der großen cytoplasmatischen Domäne, die für die Interaktion mit der geladenen Oberfläche von FliG_C – und damit auch für die Erzeugung des Drehmoments – von entscheidender Wichtigkeit sind [197, 401, 414, 416]. Die B-Untereinheit der Statoren hat nur eine Transmembrandomäne, eine kurze cytoplasmatische Domäne, aber eine längere periplasmatische Domäne, welche ein Peptidoglykanbindemotiv aufweist, die für die Verankerung der Statorkomplexe verantwortlich ist [54, 61, 340]. Ein konserviertes Aspartat in der H⁺-abhängigen MotB-Untereinheit in *E. coli* – das Aspartat an Position 32 – und das Äquivalent in der Na⁺-abhängigen PomB-Untereinheit in *Vibrio* spp. – das Aspartat an Position 24 – ist jeweils die spezifische Bindestelle der Ionen und determiniert damit unter anderem auch die Funktionsweise

der Statorkomplexe [353, 416]. In Na^+ -abhängigen Motoren wurden zudem sogenannte Hilfsproteine – MotX und MotY – entdeckt, die essentiell für die Funktionalität der polaren Flagelle in verschiedenen *Vibrio* spp und *Aeromonas hydrophila* sind [222, 223, 240, 257, 259]. MotX und MotY interagieren und bilden zusammen eine Ringstruktur (T-Ring) um den Flagellenrotor [258, 352]. Diese Ringstruktur ist in *Vibrio* spp. für die Assemblierung des Statorrings notwendig und hat zudem eine stabilisierende Funktion für die Statorkomplexe [352].

1.1.5 Filament und Haken

Die Struktur des Filaments muss bestimmte Bedingungen erfüllen, damit die Rotation der Flagelle Schub, bzw. Zug gewähren kann. Das Filament besteht aus 11 Protofilamenten, die ihrer-

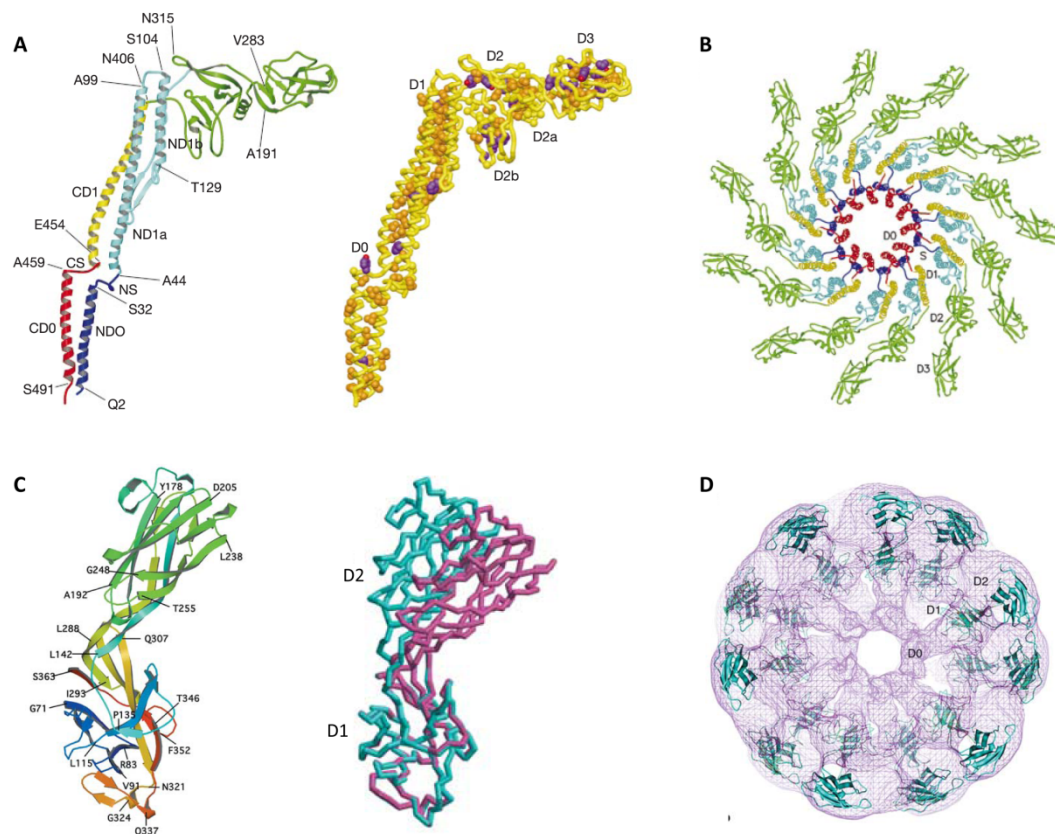


Abb. 5: Struktur des Flagellins FliC und Hakenproteins FlgE von *S. enterica* serovar Typhimurium.

A Links: Stereodiagramm des ‚ α backbone‘ von FliC. Die Farbgebung ist folgenden Aminosäureabschnitten zugehörig: 1–44, blau; 44–179, cyan; 179–406, grün; 406–454, gelb; 454–494, rot. **Rechts:** Verteilung der hydrophoben Seitenketten (gekennzeichnet sind „innen liegende“ hydrophobe Bereiche), welche die Domänen D0, D1, D2a, D2b und D3 definieren. Ala und Met, gelb; Leu, Ile und Val, orange; Phe, Tyr und Pro, lila. Das Sauerstoffatom ist rot markiert. **B** Aufsicht auf ein Flagellenfilament von der Spitze her. Elf Untereinheiten sind gezeigt (die konservierten Bereiche D0, D1 liegen innen, während die weniger konservierten Domänen nach außen zeigen). **C Links:** Stereodiagramm des ‚ α backbone‘ von FlgE31. Die Kette ist farbcodiert in den Regenbogenfarben, beginnend bei blau (N-Terminus) bis zu rot (C-Terminus). **Rechts:** Zwei Modelle von FlgE31 sind dargestellt: lila, Kristallstruktur; cyan: angepasstes Modell. **D** Aufsicht auf die, in das Atommodell des Hakens eingepasste Struktur von FlgE31. Adaptiert von [296, 407].

seits aus einer einzigen Untereinheit – dem Flagellin – bestehen (Abb. 5A und C). Die helikale Struktur ist der Mischung von zwei verschiedenen Konformationsarten des Protofilaments¹ geschuldet, wobei die „kurzen“ L-Typ Protofilamente an der Innenseite der Helix entlanglaufen [15, 47, 109, 166, 403]. Dank der halbfesten Struktur des Filaments, hat die Flagelle die Eigenschaften eines Rotors. Ein Umschalten der Drehrichtung des Filaments bewirkt jedoch eine Konformationsänderung des Filaments, die aus der Transformation der Protofilament-Orientierungen resultiert und die helikalen Eigenschaften des Filaments ändern, was in *E. coli* dazu führt, dass sich das Filament aus dem Bündel der Flagellen löst [57, 58, 369]. Der Haken ist in seiner Eigenschaft als universales Gelenk wesentlich flexibler als das Filament (Abb. 5C und D). Die Protofilamente des Hakens ändern sich kontinuierlich während der Rotation der Flagelle von „lang“ zu „kurz“, sodass sich die „kurzen“ Protofilamente immer an der Innenseite des gebogenen Hakens befinden [25]. Die flexible Struktur des Hakens ermöglicht die synchronisierte Rotation von mehreren Flagellen in einem Bündel.

1.1.6 Posttranslationale Modifikation der Flagelline

Die Flagelline der bestuntersuchten peritrichen Flagellensysteme der *Enterobacteriaceae* *E. coli* und *S. enterica* serovar Typhimurium geben keinen Hinweis auf eine Modifikation. Andere polar monotrich oder polytrich flagellierte Spezies, wie *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* oder *Helicobacter pylori*, haben eine Art Schutzhülle (engl.: *sheath*) um die polare(n) Flagelle(n) [84, 208, 221]. Eine weitere Möglichkeit der Modifikation ist die Glykosylierung der Flagelline, die bei polar flagellierten Spezies sowohl der Archaeen, als auch der Bakterien weit verbreitet zu sein scheint. Es wurden Modifizierungen an Flagellinen von Gramnegativen Organismen wie *Aeromonas* spp., *A. brasilense*, *Campylobacter* spp., *C. crescentus*, *Helicobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*, aber auch bei Grampositiven Spezies wie *Clostridium botulinum* und *Listeria monocytogenes* festgestellt [62, 89, 140, 141, 202, 238, 284, 308-311, 346, 348, 356, 398]. Auch an den Flagellinen archaeeller Flagellen wurden Glykosylierungen entdeckt, wie unter anderem in *Halobacterium salinarum*, *Methanococcus voltae* oder *Haloferax volcanii* [367, 381, 388]. In Archaeen werden Flagelline über N-glykosidische Verbindung glykosyliert, was außerhalb der Cytoplasmamembran geschieht [252]. Dabei ähnelt die Funktionsweise der Glykosylierung der Flagelline derjenigen, der Glykosylierung der archaeellen S-Schicht außerhalb der Cytoplasmamembran [388] und unterscheidet sich daher grundlegend von der Glykosylierung bakterieller Flagelline. In Bakterien wurden bisher ausschließlich O-glykosidisch verbundene Modifizierungen identifiziert, die entweder mit einem Serin oder einem Threonin verbunden sind.

Die Funktion der posttranslationalen Modifikation von Flagellinen

Die Rolle, die eine posttranslationale Modifikation von Flagellinen spielt, kann nicht für alle Organismen klar umrissen werden. Während in allen bislang untersuchten Archaeen die

¹ L-Typ: bezogen auf die links-helikale Orientierung des „langen“ Protofilaments; R-Typ: bezogen auf die rechts-helikale Orientierung des „kurzen“ Protofilaments [85, 143].

Glykosylierung der Flagelline für die Assemblierung der Flagelle wichtig zu sein scheint, ist diese Funktion in vielen, aber nicht in allen, Bakterien von Bedeutung. Beispielsweise ist die Glykosylierung der Flagelline in *Pseudomonas syringae* pathovar tabaci ausschließlich für das Anheften und Schwärmen auf Tabakblättern und für die Virulenz gegenüber der Tabakpflanze wichtig, aber nicht für die Flagellenassemblierung [347]. Allerdings zeigen neuere Studien durchaus eine Relevanz der Glykosylierung gegenüber der Stabilität des Flagellenfilaments [345]. Zudem spielt die Glykosylierung in *Campylobacter* spp., neben der Motilität und Virulenz, auch eine wichtige Rolle für den Flagellenaufbau [101, 102, 192, 202, 356].

1.2 Chemotaxis

Bakterien können Umweltsignale wahrnehmen und sich mittels der ihnen eigenen Fortbewegungsmechanismen orientieren und fortbewegen. Der Terminus Chemotaxis (gr. *chêmeia* = Chemie und altgr. *τάξις*, *taxis* = Ordnung, Aufmarsch) beschreibt die aktive und gerichtete Bewegung von Organismen hin zu günstigen, oder weg von ungünstigen Bedingungen, was den Organismen einen deutlichen Überlebensvorteil einbringt [11]. In *E. coli* wird chemotaktische Bewegung durch das Umschalten der Flagellendrehung von CCW – die Flagellen bilden ein synchron rotierendes Bündel und schwimmen geradeaus – zu CW, was dazu führt, dass sich einzelne oder alle Flagellen aus dem Bündel lösen, die Zelle nicht mehr geradeaus schwimmen kann (das sogenannte ‚Taumeln‘) und durch Brown’sche Molekularbewegung eine zufällige Reorientierung des Zellkörpers erfolgt, bevor die Zelle nach erneutem Umschalten der Flagellenrotation wieder geradeaus schwimmt. Stimuli, die einen Effekt auf Chemotaxis haben, nennt man allgemein auch Chemoeffektoren. Bewegung zu günstigen Bedingungen wird durch sogenannte Lockstoffe (engl. *attractant*) ausgelöst. In *E. coli* sind das vor allem Stoffwechsel-Substrate, beispielsweise Aspartat, Serin oder Ribose. Schreckstoffe (engl. *repellents*) ziehen eine konzentrationsabhängige, gerichtete Bewegung weg von der Quelle des Stoffes nach sich. So löst beispielsweise Acetat in *E. coli* sogenannte negative Chemotaxis aus [368]. Der bakterielle Metabolismus hat zur Folge, dass Nährstoffgradienten bzw. -limitierungen entstehen und eine Bakterienpopulation sich daher von dem Inokulationsort zu Bedingungen mit einer höheren Substratkonzentration bewegt. Daher spricht man bei Motilitätsassays in Weichagar (vgl. 4.2.7 Motilität) auch von Chemotaxisassays. Chemotaxis spielt zudem eine nicht unwesentliche Rolle in der Virulenz einiger Organismen. Dies wird unter anderem am Beispiel des Pflanzen-Pathogens *Agrobacterium tumefaciens* klar, der phenolische Substanzen, welche als Teil der Abwehrstrategie von Pflanzen bei Insektenangriffen ausgestoßen werden, wahrnehmen kann und damit zum Ursprungsort der Verletzung gelangt [317].

1.2.1 Sensitive Sensoren: Methyl-akzeptierende-Chemotaxis-Proteine

Die Aufnahme von Umweltreizen und die Weiterleitung dieser Reize an die Bewegungsapparate erfordert das komplexe Zusammenspiel von Signaltransduktion und Regulation der Bewegungsmaschinerie. Chemoeffektoren werden von Chemoakzeptoren, den

sogenannten Methyl-akzeptierenden-Chemotaxis-Proteinen (MCP, engl. *methyl-accepting chemotaxis protein*) wahrgenommen. In *E. coli* existieren fünf verschiedene solcher MCPs, die ihrerseits nur eine begrenzte Anzahl an Lock- und/oder Schreckstoffen wahrnehmen können² [333]. Enterische Proteobakterien scheinen nur eine begrenzte Zahl an Chemoakzeptoren zu benötigen – auch *S. enterica* serovar Typhimurium besitzt ‚nur‘ 9 MCPs. In Bakterien, wie zum Beispiel *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. und *Aeromonas* spp., die mit einer größeren Bandbreite an Umwelteinflüssen konfrontiert sind, als enterische Organismen, ist die Zahl der potentiellen MCPs wesentlich höher – bis zu 45 MCPs in manchen Arten³. Diese Spezies scheinen demnach ein wesentlich größeres Spektrum verschiedener Stimuli wahrnehmen zu müssen, um sich ihrem jeweiligen Habitat optimal anpassen zu können. Die spezifischen Stimuli einzelner MCPs in diesen Organismen sind jedoch weitestgehend unbekannt. MCPs sind üblicherweise Transmembranproteine und liegen als Dimere vor, die jedoch meistens in großen Clustern zusammengefasst vorliegen [40, 211]. Sie besitzen in den meisten Fällen eine Liganden-bindende Sensordomäne, welche sich im Periplasma befindet, und eine cytoplasmatische Signaldomäne [4, 111, 382]. Die Bindung eines spezifischen Liganden induziert eine Konformationsänderung, die über eine kolbenartige Bewegung an die Signaldomäne im Cytoplasma weitergegeben wird [8, 111, 264]. MCP-Dimere bilden ihrerseits Trimere und setzen sich mit CheA – der Chemotaxis-Histidinkinase – und CheW – dem Verbindungsprotein – zu einem Signalkomplex zusammen. Dieser Signalkomplex ist höchst effizient und kann dadurch schon sehr kleine, relative Änderungen in der Stoffmenge des Chemoeffektors wahrnehmen [36, 94, 335].

1.2.2 Reizweiterleitung und Regulation der Bewegung im Chemotaxissystem von *E. coli*

Die Chemotaxis-Histidinkinase CheA liegt ebenfalls als Dimer vor und phosphoryliert zwei Antwortregulatorproteine: CheY und CheB (vgl. Abb. 6). Eine verringerte Ligandenbindung an die MCPs induziert in *E. coli* das Tauseln durch eine Aktivierung der Autophosphorylierung von CheA [31, 335]. CheA~P phosphoryliert daraufhin das konservierte Aspartat von CheY oder CheB. CheY~P löst sich vom polaren Cluster der Chemorezeptoren und interagiert mit dem „Switch-Complex“ der Flagelle, um eine Richtungsänderung (CCW→CW) der Flagellenrotation zu bewirken (vgl. Abb. 6) [76, 301]. Um weiterhin eine sensitive Anpassung an sich ändernde Bedingungen gewährleisten zu können, muss CheY~P zügig dephosphoryliert werden, was die CheY-spezifische Phosphatase CheZ übernimmt. Die Adaption geschieht biochemisch gesehen auf der Ebene der reversiblen Methylierung der MCPs, wodurch Zellen den Signalstatus der letztgemessenen Chemoeffektorkonzentration zurücksetzen können [379], was eine Art

² Tar detektiert Aspartat und Maltose als Lockstoffe und Ni²⁺ und Co²⁺ als Schreckstoffe. Trg detektiert Ribose und Galaktose als Lockstoffe. Tsr detektiert Serin als Lockstoff und Indol, Leucin und schwache Säuren als Schreckstoffe. Tap detektiert Dipeptide als Lockstoffe. Aer fungiert als Sensor für das Redoxpotential der Elektronentransportkette und gilt als Energiesensor [333].

³ *Vibrio cholerae* O1 bivoar el Tor (trotz der ähnlichen Gesamtgenomgröße der genannten Organismen)

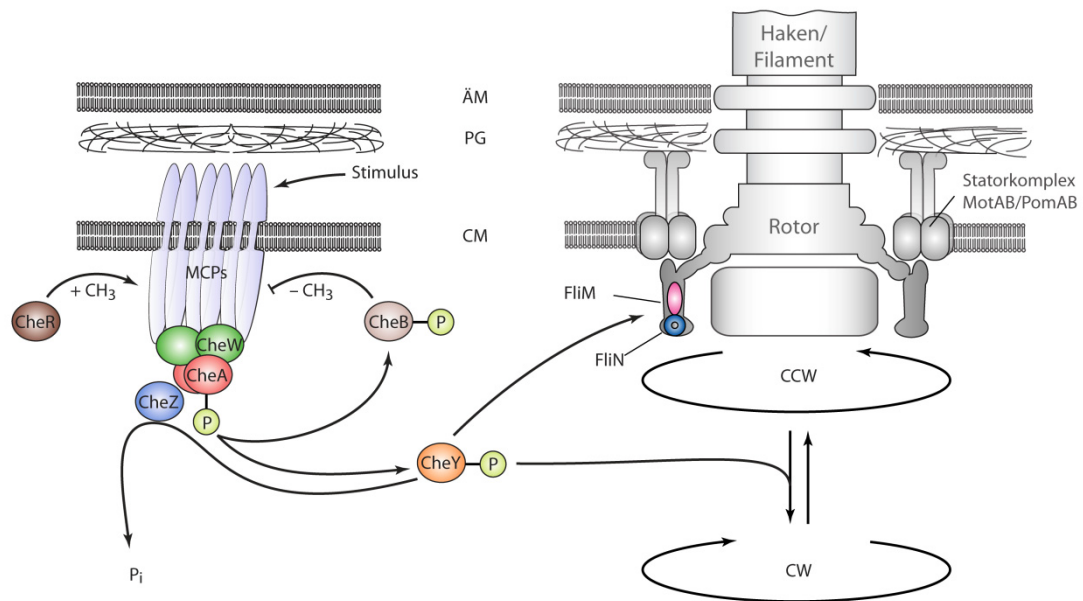


Abb. 6: Model des Chemotaxisystems von *E. coli* (links) und die Interaktion mit dem „Switch Complex“ der Flagelle (rechts).

MCPs nehmen Änderungen in der Konzentration von Chemoeffektoren (Stimulus) wahr. Dieses Signal wird über CheW an die Chemotaxis Histidinkinase CheA weitergegeben, was bei geringerer Chemoeffektorkonzentration deren Autophosphorylierungsaktivität stimuliert. CheA~P phosphoryliert zwei Antwortregulatoren: CheY und CheB. CheY~P interagiert mit dem Flagellenmotor und induziert ein Umschalten der Flagellenrotationsrichtung von CCW (gegen den Uhrzeigersinn) zu CW (im Uhrzeigersinn). CheB~P in dessen Funktion als Methylesterase ist zusammen mit der Methyltransferase CheR für die Adaption verantwortlich. CheZ ist eine für CheY spezifische Phosphatase und somit für schnelle Signaltermination nach einer Stimulation verantwortlich. Modifiziert nach [278].

Kurzzeitgedächtnis für Bakterien darstellt. Die CheA-Autophosphorylierung wird über die Methylierung spezifischer Glutaminsäure-Reste der MCPs durch die Methyltransferase CheR stimuliert. CheB – der zweite Antwortregulator, der von CheA phosphoryliert werden kann – ist eine Methylesterase, die kontinuierlich die Methylgruppen an den MCPs abspaltet und deren Aktivität damit senkt. Die Funktion der Methylesterase ist etwa 100-fach höher, wenn diese von CheA phosphoryliert wurde [9]. Bei einem negativen Signal, wie einer Abnahme in der Lockstoffkonzentration, wird in *E. coli* die Autophosphorylierung von CheA stimuliert, was zu einer erhöhten Konzentration von CheY~P führt und damit das Taumeln induziert. Die Adaption geschieht langsamer und über einen längeren Zeitraum hinweg durch die Demethylierung der aktiven MCPs durch CheB~P, was die Aktivität der MCPs und daher indirekt auch die Aktivität von CheA senkt. Demzufolge sinkt auch das Level phosphorylierter CheY Moleküle, was zu seltenerem Taumeln führt und somit den Status Quo vor dem Stimulus wiederherstellt.

1.3 Vielfalt und Physiologie der Flagellensysteme

Es gibt eine Vielzahl von Bewegungsmechanismen in Bakterien, aber die Fortbewegung mit Flagellen ist die mit Abstand effektivste. Flagellensysteme haben sich in verschiedenen Organismen vermutlich im Bezug auf die verschiedenen Habitate entwickelt. Typische Vertreter der

enterischen Proteobakterien wie *E. coli* und *S. enterica* serovar Typhimurium haben ein peritriches Flagellensystem mit jeweils etwa 4 – 6 Flagellen pro Zelle. Die Flagellen dieser Organismen werden über H^+ -Gradienten über der Cytoplasmamembran betrieben. Aquatisch vorkommende Bakterien haben jedoch zumeist nur eine polare Flagelle die oftmals über Na^+ -Gradienten betrieben werden. Im Folgenden sollen Eigenschaften und Besonderheiten von unterschiedlichen Flagellensystemen verschiedener Organismen genauer beleuchtet werden.

1.3.1 Polare und peritriche Flagellensysteme

Die bereits erwähnten enterischen Proteobakterien *E. coli* und *S. enterica* sind im Bezug auf Flagellen-vermittelte Motilität und Chemotaxis die wohl bestuntersuchten Prokaryoten. *B. subtilis* hat ebenfalls ein peritriches Flagellensystem, doch zwei verschiedene Statorsysteme. Während das H^+ -getriebene dominante Statorsystem MotAB für Schwimmen und Schwärmen⁴ benötigt wird, trägt ein zusätzliches Statorsystem MotPS zur Motilität des Organismus bei, wenn eine erhöhte Na^+ -Ionen Konzentration, oder ein erhöhter pH im Medium vorliegt [126, 127]. *P. aeruginosa* besitzt eine einzelne polare Flagelle, jedoch ebenfalls zwei Statorsysteme, wobei in diesem Fall beide H^+ -abhängig sind. MotAB ist essentiell für die Motilität in flüssigem Medium, während MotCD essentiell für volle Funktionalität der Flagelle in Medium mit erhöhter Viskosität oder für das Schwärmen über Oberflächen ist [73, 365]. Interessanterweise besitzt *P. aeruginosa* ebenfalls ein MotY-Homolog, welches für die Funktion des Statorsystems MotAB essentiell ist [73]. Die Helferproteine wie MotX und MotY scheinen daher nicht, was zunächst vermutet wurde, eine Eigenart der Na^+ -getriebenen Statorsysteme zu sein. Diese Erkenntnis wird auch von der Entdeckung eines zweiten MotY-Proteins in *V. parahaemolyticus* gestützt, welches in die Funktionalität des H^+ -betriebenen Motors der lateralen Flagellen dieses Organismus involviert ist [342]. Die Zahl der Organismen mit mehr als einem Statorsystem pro Flagellensystem scheint ebenfalls höher zu sein, als anfangs vermutet und lässt auf äußerst dynamische Flagellensysteme schließen, die gezielt den jeweiligen Umweltbedingungen der Mikroorganismen angepasst sind [358].

Chemotaxis in Organismen mit einer polaren Flagelle

Organismen in oligotrophen Habitaten wie beispielsweise marinen Gewässern besitzen meistens eine polare Flagelle mit einem bidirektionalen Motor, der in der Regel Na^+ -Ionen-abhängig ist. Anders als peritrich flagellierte Organismen können Bakterien mit einer polaren Flagelle nicht taumeln. Die Hydrodynamik bei niedriger Reynolds-Zahl⁵ schreibt vor, dass Organismen mit einer polaren Flagelle – abgesehen von der leichten, thermisch abhängigen, Reorientierung durch Molekülbewegungen – nur den Weg zurück schwimmen können, den sie gekommen sind, wenn sich die Rotationsrichtung der Flagelle ändert. Wie können also solche

⁴ Schwärmen bezeichnet die Flagellen-vermittelte Bewegung von Zellpopulationen über Oberflächen

⁵ Dimensionslose Zahl (kurz: Re), die das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften beschreibt

Organismen effektives chemotaktisches Schwimmverhalten an den Tag legen? In *Pseudomonas citronellolis* sind mehrere kurze Rückwärts-Schwimmbewegungen vonnöten, die längeres Vorwärts-Schwimmen unterbrechen, um eine effektive Richtungsänderung zu erreichen [351]. Diese Art des sogenannten Vor-und-Zurück⁶ Schwimmens wurde auch in einigen anderen Organismen wie *Pseudoalteromonas haloplantis*, *V. alginolyticus* und *Deleya marina* beobachtet, wenn diese Organismen Lockstoffen folgen, die von bestimmten Algen abgesondert werden [20, 139, 199, 214, 235]. Dabei wurde eine interessante Beobachtung gemacht, die zeigte, dass sich die Symmetrie des Vor-und-Zurück Schwimmverhaltens ändert sobald – in diesem Fall *V. alginolyticus* – in der Nähe einer Oberfläche schwamm. Während die Zellen relativ geradlinig vorwärts schwammen, wurde ein kreisförmiges Rückwärts-Schwimmen der Zellen beobachtet, was die Autoren mit dem sogenannten ‚Wand-Effekt‘ begründeten [214]. Dieser Effekt kann durch die hydrodynamische Interaktion mit der Oberfläche erklärt werden, die ein Gieren (Drehen) des Zellkörpers verursacht [99]. Ein ähnliches Phänomen konnte im Schwimmverhalten von *C. crescentus* beobachtet werden, dessen Schwimmrichtung zunehmend willkürlich wird, wenn Zellen in die Nähe von Oberflächen kommen, was durch eine Amplifizierung der thermischen Fluktuationen erklärt wurde [189]. Eine völlig neue Art eine zufallsgemäße Verteilung der Bewegungsrichtung – unabhängig von Oberflächen – zu beeinflussen wurde ebenfalls in *V. alginolyticus* entdeckt. In diesem Organismus übernimmt die Flagelle nicht nur die Funktion eines Propellers, sondern kann zudem als Ruder wirken [399]. Der typische Bewegungsablauf startet mit dem Vorwärts-Schwimmen, gefolgt von einem Rückwärts-Schwimmen in die entgegengesetzte Richtung. Bevor die Zelle jedoch wieder vorwärts schwimmt, macht die polare Flagelle der Zelle eine rudertartige Bewegung. Diese Bewegung der Flagelle beruht darauf, dass das Filament und der Zellkörper zum Zeitpunkt der Richtungsänderung der Flagellenrotation nicht koaxial sind. Durch die CCW-Rotation der Flagelle wird dieser Knick⁷ sehr schnell verstärkt. Die Reorientierung des Zellkörpers um etwa 90° geschieht zügig – in weniger als 0,1 s – während sich der Schwerpunkt der Zelle nur um etwa eine halbe Körperlänge des Bakteriums verschiebt. Im letzten Schritt der Ruderbewegung der Flagelle richtet sich die Flagelle wieder koaxial mit dem Zellkörper aus. Durch das gleichzeitige Knicken und Rotieren der Flagelle wird das ‚Scallop Theorem‘ für das Leben bei niedriger Reynolds-Zahl ($\sim 10^{-5}$) ausgehebelt [283, 399].

1.3.2 Duale Flagellensysteme

Einige Organismen mit einem polaren Flagellensystem haben ein zweites, zusätzliches Flagellensystem mit einzelnen, oder mehreren eigenen Statorkomponenten. Bekannte Vertreter mit sogenannten dualen Flagellensystemen sind zum Beispiel *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila*, *Azospirillum* und *Rhodospirillum* spp. [146, 227, 321, 322, 350]. Generell nutzen die genannten Organismen ihre polare Flagelle für das Schwimmen durch flüssiges Medium, wogegen laterale Flagellen erst dann produziert werden, wenn die Viskosität des Mediums zunimmt, oder um über Oberflächen schwärmen. Manche Organismen induzieren das sekundäre Flagellensystem auch

⁶ $\sim 180^\circ$ -Winkel zwischen der Vorwärts- und der Rückwärts-Schwimmrichtung

⁷ Der Winkel des Knicks ist zufällig, hat jedoch die höchste Wahrscheinlichkeit bei etwa 90° zu liegen

bei steigender Temperatur, oder während statischen Wachstums in flüssigem Medium [27, 212]. Alle bislang identifizierten Organismen mit dualen Flagellensystemen produzieren beide Flagellentypen in viskosem Medium, oder auf Oberflächen, auch wenn nur die funktionalen lateralen Flagellen für das Schwärmen benötigt werden, abgesehen von *R. centenum*. Dieser Organismus kann nur schwärmen, wenn sowohl die lateralen, als auch die polaren Flagellen funktional sind [138]. Laterale Flagellen haben im Allgemeinen andere Charakteristika im Bezug auf Morphologie, Eigenschaften und immunologische Relevanz [89, 322]. *Vibrio* spp. produzieren konstitutiv polare Flagellen mit einer Schutzhülle⁸ [323]. Wenn diese Organismen in viskosem Medium oder auf Oberflächen wachsen, durchlaufen sie eine Zellmetamorphose und werden zu sogenannten Schwärmerzellen. Diese Differenzierung erfordert das Stoppen der Zellteilung – was zu verlängerten Zellkörpern führt – und das Produzieren einer großen Zahl von lateralen Flagellen [221, 285, 371]. *Aeromonas* spp. haben zumeist konstitutiv produzierte polare Flagellen und induzierbare laterale Flagellen ohne Schutzhülle, wobei beide Flagellensysteme eine Glykosylierung der Filamente aufweisen [89, 160, 284]. Eine generelle Eigenschaft der sekundären Flagellensysteme ist das Fehlen einiger Gene, die in polaren Flagellensystemen zu finden sind, so zum Beispiel *fliO*, dessen Genprodukt vermutlich eine Rolle in der Exportmaschinerie der Flagelle spielt, was jedoch selbst in *E. coli* nicht umfassend geklärt ist [312]. Des Weiteren fehlen Komponenten, die Lokalisation und Anzahl der Flagellen in polaren Systemen regulieren, wie FlhF und FlhG. Regulatorische Elemente, wie das Zwei-Komponenten-System der polaren Flagellensysteme (FlaLM in *V. parahaemolyticus*, FleSR in *P. aeruginosa*, oder FlrBC in *V. cholerae* und *A. hydrophila*) gehen lateralen Flagellensystemen ebenfalls ab. Phylogentische Analysen zeigen, dass sekundäre Flagellensysteme in Proteobakterien vermutlich zweimal entstanden sind, einmal aus einer Duplikation und ein zweites mal durch horizontalen Gentransfer eines primären Flagellensystems [194, 195].

Die dualen Flagellensysteme von *Vibrio parahaemolyticus* und *Aeromonas hydrophila*

Die am besten charakterisierten dualen Flagellensysteme sind die von *V. parahaemolyticus* und *A. hydrophila*. Die Assemblierung und Funktionalität der polaren Flagelle im Erstgenannten benötigt etwa 60 Gene (vgl. Tabelle 1), die in zwei großen nicht zusammenhängenden Regionen auf das Chromosom I verteilt sind, plus der abseits liegenden Statorgene, und 38 Gene für die lateralen Flagellen, die in zwei Regionen auf Chromosom II liegen [155, 342]. Bei *A. hydrophila* sind nur etwa 55 Gene, die auf fünf Regionen im Genom verteilt sind, nötig eine funktionelle polare Flagelle zu assemblieren, und ebenfalls 38 Gene für laterale Flagellen in einem zusammenhängenden Cluster [7, 48, 49, 89]. In beiden Spezies sind die Gene für strukturelle Komponenten distinkt für das jeweilige Flagellensystem [158, 225]. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht sind die Flagellensysteme von *Azospirillum* spp. und *R. centenum*, deren polares und laterales Flagellensystem einige strukturelle oder regulatorische Elemente teilen [138, 227, 307]. Sowohl in *Vibrio* spp., als auch in *Aeromonas* spp. werden die polaren und lateralen Flagellensysteme von unterschiedlichen Ionen betrieben. In *Vibrio* spp. setzt sich der Motor der Flagelle aus dem Na⁺-getriebenen Statorkomplex PomAB und

⁸ vgl. Kapitel 1.1.6 Posttranslationale Modifikation der Flagelline

den Helferproteinen MotX und MotY_P zusammen, während die laterale Flagelle von dem H⁺-betriebenen Statoren MotAB und dem Helferprotein MotY_L abhängt [17, 146, 342]. Eine ähnliche Situation liegt in *A. hydrophila* vor, doch dieser Organismus hat zwei Statorsysteme für die polare Flagelle, welche Na⁺-getrieben sind, aber vermutlich bei unterschiedlichen Natriumkonzentrationen im Medium optimal funktionieren [231, 321]. Zudem fehlt ein MotY-Homolog sowohl für die polare, als auch für die laterale Flagelle [48, 49].

Regulation der lateralen Flagellensysteme

Die Regulation des sekundären Flagellensystems von *V. parahaemolyticus* ist die am detailliertesten beleuchtete aller Organismen mit dualen Flagellensystemen (vgl. Abb. 7) [342]. Die Regulation des Flagellensystems hängt von einem σ^{54} -abhängigen Masterregulator LafK (homolog zu FlaK, oder FlrA des polaren Flagellensystems), der die Transkription der Klasse II Gene steuert, sowie den für die späten Gene des lateralen Flagellensystems spezifischen Sigmafaktor σ^{28} , der wiederum die Transkription der späten (Klasse III) Gene reguliert. Diese Art der Transkriptions-Hierarchie scheint auch anderen γ -Proteobakterien gemein zu sein, wie zum Beispiel *A. hydrophila* [48]. Masterregulatoren für die Flagellensynthese sind essentiell in Organismen mit einem polaren Flagellensystem, jedoch scheint dies nicht für alle Organismen mit dualen Flagellensystemen zu gelten, da in *V. parahaemolyticus* der Verlust des Masterregulators für das polare Flagellensystem (FlaK) durch LafK kompensiert werden kann [156]. Neuere Studien bezüglich LafK zeigen jedoch,

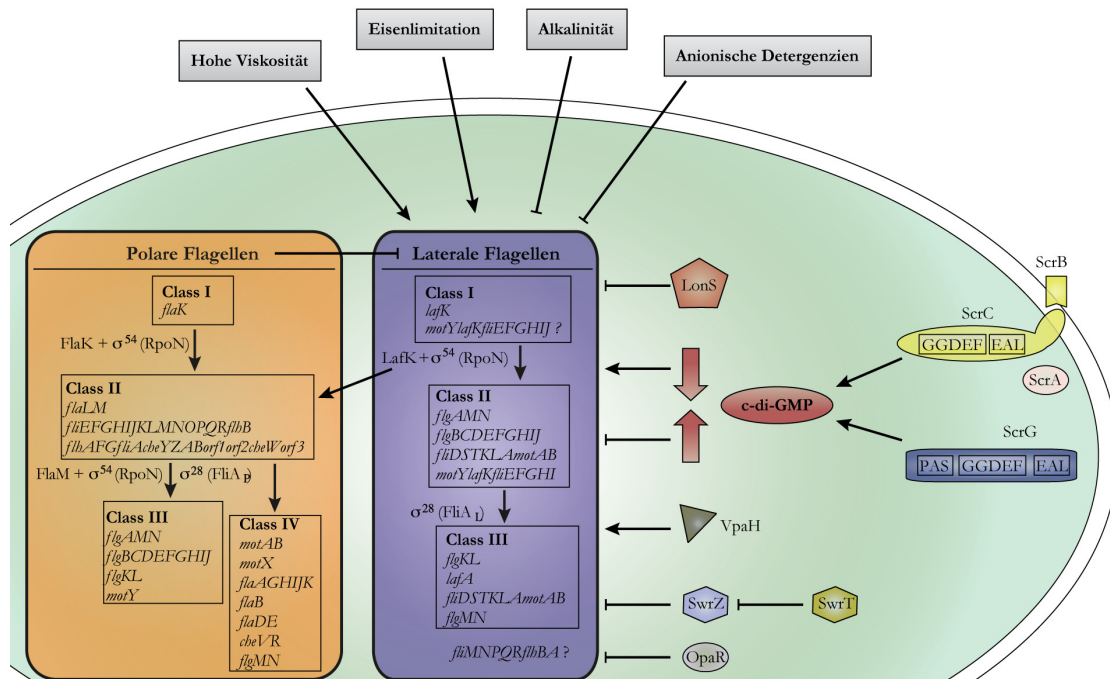


Abb. 7: Regulationskaskade des dualen Flagellensystems von *V. parahaemolyticus* mit intrazellulären und extrazellulären Faktoren, welche die Regulation der lateralen Flagellen beeinflussen.

Die Einordnung mancher Gene bezüglich der Transkriptionshierarchie ist noch nicht aufgeklärt (gekennzeichnet mit einem ?). Das Cytoplasma ist in grün gehalten. Modifiziert nach [135, 231].

dass dieser Regulator weitere, nicht-flagellenrelevante Gene transkriptionell reguliert und zudem einige Flagellengene des lateralen Flagellensystems unabhängig von der Aktivität von LafK exprimiert werden, was die Eigenschaft von LafK als Masterregulator der lateralen Flagellensynthese in Frage stellt [92].

Die Produktion und das Unterhalten eines zusätzlichen Flagellensystems bedeutet für die Zelle einen enormen energetischen Mehraufwand. Aus diesem Grund unterliegen die lateralen Flagellensysteme einer strengen – von einer Reihe von Umweltbedingungen abhängigen – Regulation. Wie zuvor erwähnt, kann die Flagelle als Mechanosensor wirken, was *V. parahaemolyticus* nutzt, um eine steigende Viskosität des Mediums zu registrieren. Dieses Umweltsignal hat zur Folge, dass die verringerte Flagellenrotation zur Expression von Genen führt, die für laterale Flagellenkomponenten codieren, auch wenn der genaue Mechanismus dieses regulatorischen Zusammenhangs noch nicht geklärt ist. Nichtsdestotrotz scheint die Regulation des lateralen Flagellensystems in *V. parahaemolyticus* eng mit der Regulation/Assemblierung der polaren Flagelle zusammenzuhängen. Defekte, die sich auf die Assemblierung oder die Flagellen-vermittelte Motilität der polaren Flagelle auswirken, führen zu einer konstitutiven Expression der Gene des lateralen Flagellensystems [5, 146, 219], was jedoch nicht für *A. hydrophila* gilt [7, 48]. Zusätzlich führen das Fehlen von Eisen im Medium in *V. parahaemolyticus* zu einer Stimulation und alkalische Bedingungen zu einer Inhibition der Expression flagellenrelevanter Gene des lateralen Flagellensystems [157, 220]. Der globale molekulare Botenstoff zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP), ist ein weiteres zentrales regulatorisches Element, welches das Umschalten zwischen sessilem und planktonischem Lebensstil determiniert [115, 137, 173, 326, 357]. Im Speziellen ist c-di-GMP auch für die Regulation der Expression der Gene für laterale Flagellen in *V. parahaemolyticus* involviert. Zwei Diguanylatzyklasen ScrC und ScrG mit GGDEF-EAL⁹ Domäne regulieren [292] – über die intrazelluläre Konzentration von c-di-GMP – entgegengesetzt unter anderem die Produktion von lateralen Flagellen. Eine hohe Konzentration an c-di-GMP führt zu einer verringerten Transkription der lateralen Flagellengene, während eine niedrige Konzentration das Gegenteil bewirkt (vgl. Abb. 7).

Auch die Chemotaxissysteme von peritrich flagellierten Organismen, wie *S. enterica* serovar Typhimurium können eine Rolle in der Regulation von Flagellensystemen spielen (siehe oben: Kapitel 1.1.2) [385]. In *R. centenum* existiert, neben dem primären Chemotaxissystem, ein zweites System, welches zwar keinen Einfluss auf die chemotaktische Bewegung, jedoch umso mehr auf die Assemblierung des dualen Flagellensystems zu haben scheint [27]. In *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* existiert nur ein Chemotaxissystem und somit nur ein CheY Protein. In *V. alginolyticus* konnte gezeigt werden, dass CheY mit dem polaren und dem lateralen System interagieren kann, jedoch auf unterschiedliche Weise. Der Flagellenmotor des lateralen Flagellensystems funktioniert unidirektional und wird durch Interaktion mit CheY in der Geschwindigkeit der Flagellenrotation gebremst, wogegen der Motor der polaren Flagelle bidirektional rotieren kann und CheY hier die Richtungsänderung der Flagellenrotation stimuliert [164].

⁹ GGDEF-EAL Domänen-Proteine können die Konzentration von c-di-GMP in Zellen modulieren [292].

1.4 Der Genus *Shewanella*

Der Genus *Shewanella* ist vor allem aufgrund seiner Fähigkeit, verschiedenste alternative Elektronenakzeptoren zu nutzen, bekannt geworden und gehört zu der Ordnung der *Alteromonadales*. Bereits in den frühen 30er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden zum ersten Mal Vertreter dieser Spezies von der Oberfläche ranziger Butter isoliert und zu diesem Zeitpunkt als *Achromobacter putrefaciens* klassifiziert [67]. Nach einer ganzen Serie von Reklassifizierungen – über *Pseudomonas putrefaciens* hin zu *Alteromonas putrefaciens* – bis in die späten 1980er Jahre war die Identitätsfindung mit der von MacDonnell und Colwell 1985 vorgeschlagenen Benennung eines neuen Genus *Shewanella* (zu Ehren von Dr. James M. Shewan und seinen Errungenschaften bezüglich der Mikrobiologie von Fischen) abgeschlossen [22, 181, 205, 209]. Allgemein ist der Genus *Shewanella* den Gramnegativen, stäbchenförmigen γ -Proteobakterien zuzurechnen. Die Stäbchen haben eine Größe von etwa 2 – 3 μm bei einem Durchmesser von 0,4 – 0,7 μm . Die bislang isolierten und charakterisierten Vertreter von *Shewanella* sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Bis dato isolierte und charakterisierte Vertreter des Genus *Shewanella*.

Stamm/Spezies	Geographischer Ursprung	Habitat, Charakteristika	Referenz
<i>S. abyssi</i> c941	Suruga Bucht, Japan	Tiefseesediment, Tiefe: 2406–2409m	[237]
<i>S. affinis</i>	Peter-der-Große-Bucht, Japanisches Meer	<i>Phascolosoma japonicum</i> , Spritzwurm	[130]
<i>S. algae</i> OK-1	Honshu Insel, Japan	Rotalgen, Schleimschicht des Kugelfisches	[325]
<i>S. algidipiscicola</i> S13	Ostsee	Scholle	[305]
<i>S. amazonensis</i> SB2B	Amapa Fluss, Brasilien	Sediment; suboxisches Redoxbedingungen; Tiefe: 1 m	[376]
<i>S. aquimarina</i> SW-120	Gelbes Meer, Korea	Meerwasser	[410]
<i>S. arctica</i> IR12	Antarktisches Meer	Sediment	[154]
<i>S. atlantica</i>	Hafen von Halifax , Nova Scotia, CA	Sediment, 50 nautische Meilen vor der Küste, Tiefe: 215 m	[413]
<i>S. baltica</i> OS155	Ostsee	Meerwasser; oxische Zone O ₂ 2ml/l; Tiefe: 90 m	[39]
<i>S. baltica</i> OS185	Ostsee	Meerwasser; oxisch-anaoxische Grenzschicht; Tiefe: 120 m	[39]
<i>S. baltica</i> OS195	Ostsee	Meerwasser; anoxische Zone; Tiefe: 140 m	[39]
<i>S. baltica</i> OS223	Ostsee	Meerwasser; oxisch-anaoxische Grenzschicht; Tiefe: 120 m	[39]
<i>S. basaltis</i> J83	Soesoggak, Jeju Insel, Korea	schwarzer Vulkansand	[51]
<i>S. benthica</i> KT99	Tonga-Kermadec Graben	Tiefsee; Hochdruckzone; Tiefe: 9000 m	[65]
<i>S. canadensis</i> HAW-EB2	Hafen von Halifax , Nova Scotia, Kanada	Sediment, 50 nautische Meilen vor der Küste, Tiefe: 215 m	[413]
<i>S. chilikensis</i> JC5	Chilika Lagune, Indien (19° 47' Nord 85° 49' Ost)	Brackwasser, Sediment	[343]
<i>S. corallii</i> fav-2-10-05	Golf von Eilat, Israel (29° 51' Nord 34° 94' Ost)	Mucus Gewebeschnitt einer Koralle (Genus <i>Favia</i>)	[324]
<i>S. decolorationis</i> S12	Abwasseraufbereitungsanlage, Guangzhou, China	Belebtschlammbecken	[400]
<i>S. denitrificans</i> OS217	Ostsee	Meerwasser; oxisch-anaoxische Grenzschicht; Tiefe: 120 m	[38]
<i>S. dokdonensis</i> UDC329	Küste vor der Dokdo Insel, Dongdo, Korea	Meerwasser	[344]
<i>S. donghaensis</i>	Japanisches Meer	Tiefseesediment, Tiefe: 3300 m	[405]
<i>S. fidelis</i>	Südchinesisches Meer	Tiefseesediment	[133]
<i>S. fodinae</i> JC15	Godavarikhani, Distrikt Karimnagar, Andhra Pradesh, Indien (18° 41' Nord 79° 32' Ost)	Schlammprobe aus einer Kohlemine, 204,35 m unter der Oberfläche	[339]
<i>S. frigidimarina</i> ACAM 591	Prydz Bucht, Antarktisches Meer	Unterseite wachsender Eisschicht	[33]

Stamm/Spezies	Geographischer Ursprung	Habitat, Charakteristika	Referenz
<i>S. gaetbuli</i> TF-27	Mokpo, Korea	Watt	[408]
<i>S. gelidimarina</i> ACAM 456	Prydz Bucht, Antarktisches Meer	Unterseite wachsender Eisschicht	[33]
<i>S. glacialipiscicola</i>	Ostsee	Kabeljau	[305]
<i>S. hafniensis</i>	Ostsee	Kabeljau	[304]
<i>S. halifaxensis</i> HAW-EB4	Hafen von Halifax , Nova Scotia, Kanada	Sediment, Schwerindustriehalde, Tiefe: 215 m	[412]
<i>S. haliotis</i> DW01	Südsee, Republik Korea	Darmtrakt der Abalone <i>Haliotis discus hannai</i>	[152]
<i>S. indica</i> KJW27	Anlegesteg von Karwar, Westküste Indiens, Arabisches Meer	Sediment	[378]
<i>S. irciniae</i>	Mittelmeer	Mariner Schwamm <i>Ircinia dendroides</i>	[183]
<i>S. japonica</i>	Peter-der-Große-Bucht, Japanisches Meer	Meerwasser, Tiefe: 0,5 – 1,5 m (Salinität 32‰, Temperatur 15°C)	[132]
<i>S. kaireitica</i> c931	Suruga Bucht, Japan	Tiefseesediment, Tiefe: 2406–2409m	[237]
<i>S. litorisediminis</i> SMK1-12 ^T	Westküste von Korea	flaches Gezeitensediment	[182]
<i>S. livingstonensis</i> Ac10	Antarktische Küste	Meerwasser	[174]
<i>S. lohica</i> PV-4	Hawaii, Imperator-Rücken	Hydrothermaler Schlot, eisenhaltige Schlämme, Tiefe: 1325 m	[87]
<i>S. marina</i> C4	Südsee nahe Gwangyang (34° 51' Nord 128° 47' Ost), Republik Korea	Meerwasser	[262]
<i>S. marinintestina</i> IK-1	Yokohama, Japan	Tintenfisch, Körper	[303]
<i>S. marisflavi</i> SW-117	Gelbes Meer, Korea	Meerwasser	[410]
<i>S. morhuae</i> U1417	Ostsee	Kabeljau	[304]
<i>S. olleyana</i> ACEM 9	Tasmanien, Australien	Huminsäurereicher Flussarm des Huon Flusses	[328]
<i>S. oneidensis</i> MR-1	Lake Oneida, USA	Limnisches Sediment, anoxische Zone, Mn(IV)-Reduktion	[377]
<i>S. pacifica</i> R10SW1	Chazhma Bucht, Japanisches Meer, Pazifik	Meerwasser	[129]
<i>S. pealeana</i> ANG-SQ1	Wood Hole Harbor, USA	Tintenfisch, Nidamentaldrüse	[185]
<i>S. piezotolerans</i> WP3	Westpazifik (142°Ost, 8°Nord)	Sediment, Tiefe: 1914 m	[384]
<i>S. pneumatophori</i> SCRC-2738	Pazifik	Pazifikmakrele, Intestinaltrakt	[116]
<i>S. profunda</i> LT13a	Nankai-Becken, Japan	Tiefseesediment; Tiefe: 4790,7 m, 4,15 m tief im Sediment	[361]
<i>S. psychrophila</i> WP2	Westpazifik (142°Ost, 8°Nord)	Sediment, Tiefe: 1914 m	[384]
<i>S. putrefaciens</i> CN-32	Albuquerque, USA	Schiefersandstein, Tiefe: 250 m	[83]
<i>S. putrefaciens</i> 200	Alberta, CA	Rohöl-Rohrleitung	[255]
<i>S. sairae</i> SM2-1	Pazifik vor Japan	Makrelenhecht, Intestinaltrakt	[303]
<i>S. schlegeliana</i> HRKA1	Hiroshima, Japan	<i>Tautoga onitis</i> , Meerbrasse, Intestinaltrakt	[303]
<i>S. sediminis</i> HAW-EB3	Hafen von Halifax , Nova Scotia, Kanada	Sediment, 50 nautische Meilen vor der Küste, Tiefe: 215 m	[411]
<i>S. seohaensis</i> S7-3	Saemankum, Westküste Koreas	Wattsediment	[409]
<i>S. sp.</i> ANA-3	Wood Hole Harbor, USA	Brackwasser, Arsenbehandelter Holzpier	[294]
<i>S. sp.</i> MR-4	Schwarzes Meer	Meerwasser; oxische Zone, 16°C, Tiefe: 5 m	[251]
<i>S. sp.</i> MR-7	Schwarzes Meer	Meerwasser; anoxische Zone; Hoher Nitratgehalt, Tiefe: 60 m	[251]
<i>S. sp.</i> W3-18-1	Küste von Washington, Pazifik	Sediment, unterhalb oxischen Meerwassers, Tiefe: 630m, 5 – 6 cm unter der Meeresbodenoberfläche	[246]
<i>S. spongiae</i> HJ039 ^T	Küste vor Korea, Japanisches Meer	Mariner Schwamm, Tiefe: 20m	[404]
<i>S. surugensis</i> c959	Suruga Bucht, Japan	Tiefseesediment, Tiefe: 2406–2409m	[237]
<i>S. upenei</i> 20–23R	Korea	Bensasi Meerbarbe (<i>Upeneus bensasi</i>), Intestinaltrakt	[153]
<i>S. vesiculosa</i> M7	Südliche Shetlandinseln, Antarktisches Meer	Sediment	[34]
<i>S. violaceae</i> DSS12	Ryuku Graben, Phillipinische See	Sediment, Tiefe: 5110 m	[253]
<i>S. waksmanii</i>	Peter-der-Große-Bucht, Japanisches Meer	<i>Phascolosoma japonicum</i> , Spritzwurm	[131]
<i>S. woodyi</i> MS32	Straße von Gibraltar, Mittelmeer	Detritus, Tiefe: 370 m	[217]
<i>S. xiamenensis</i>	Küste vor Xiamen, China	Sediment	[120]

1.4.1 Stoffwechselphysiologie

Mit den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts begann aufgrund der Fähigkeit von *Shewanella*, Mangan und Eisen unter anaeroben Bedingungen zu reduzieren, auch die Aufmerksamkeit auf diesen interessanten Genus zuzunehmen [247, 248]. Mittlerweile sind etliche terminale Elektronenakzeptoren bekannt, unter denen sich auch teilweise toxische und unlösliche Schwermetalle befinden, die *Shewanella* nutzen kann. Zu den terminalen Elektronenakzeptoren gehören unter anderem Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO) [341], Fe(III) Chelate und Fe(III) Oxide [12, 72, 171, 247, 290, 372, 373], Mn(III und IV) Chelate und Mn(III und IV) Oxide [69, 170, 177], elementarer Schwefel, Sulfit, Thiosulfat [272], Dimethylsulfoxid (DMSO) [247], Nitrat, Nitrit [298] und Fumarat [247]. Neben den verbreiteten Metall- und Nichtmetallverbindungen gehören auch seltene Metalle zum Elektronenakzeptor-Repertoire von *Shewanella*, so zum Beispiel Uranat [U(VI)] [45], Chromat [Cr(VI)] [389], Iodat [79], Technetium [391], Neptunium [196], Plutonium [32, 123], Selenit, Tellurit [161] und Vanadat [50].

Die Fähigkeit, Schwermetalle zu reduzieren, hat die Familie der *Shewanellaceae* nicht zuletzt zu potentiellen Wiederaufbereitungszwecken vergifteter oder radioaktiv verseuchter Areale interessant werden lassen.

1.4.2 Motilität von *Shewanella*

Alle bislang isolierten Spezies von *Shewanella* sind motil, wobei deren Bewegung in allen Fällen mindestens über eine polare Flagelle vermittelt wird. Der wohl bekannteste Vertreter seiner Art ist *S. oneidensis* MR-1, der aus dem Oneida See im Staate New York – und damit auch als einziger Vertreter seiner Art – aus einem limnischen Habitat isoliert wurde [377]. Das Genom von *S. oneidensis* MR-1 mit einer Größe von etwa 4,9 MBp und einem Megaplasmid mit einer Größe von etwa 1,6 MBp ist vollständig sequenziert, besitzt einen GC-Gehalt von 43 % und ca. 5.000 offene Leserahmen [113]. Die hohe Salztoleranz (bis 300 μ M) dieses Organismus legt allerdings die Vermutung nahe, dass er aus einem marinen Habitat eingewandert ist, was auch durch die nahe Verwandtschaft zu marinen Vertretern der Gattung gestützt wird (vgl. Abb. 8). In der Tat gibt es einige Hinweise auf die andauernde evolutive Anpassung von *S. oneidensis* MR-1 an ein Leben mit niedrigem Salzgehalt. *S. oneidensis* MR-1 besitzt neben einem Na⁺-getriebenen Statorsystem PomAB ein zweites H⁺-getriebenes Statorsystem MotAB, welches vermutlich durch horizontalen Gentransfer akquiriert wurde, jedoch ausschließlich ein polares Flagellensystem [270]. Die Funktion des polaren Flagellensystems ist zudem von den Statorkomponenten MotX und MotY abhängig. Diese haben jedoch, im Gegensatz zu *Vibrio* spp., keinen Einfluss auf die Assemblierung des PomAB Statorkomplexes [163, 352]. Das MotAB Statorsystem ist unabhängig von den Helferproteinen MotX oder MotY und kann bei sehr geringer Natriumkonzentration in der Umgebung zur Schwimmgeschwindigkeit des Bakteriums beitragen [270]. Neben diesem funktionellen *in vivo* Stator-Austausch, konnte auch eine funktionelle Koexistenz beider Statorsysteme in einem einzigen Statorring gezeigt werden (Dissertation, Anja Paulick). Das

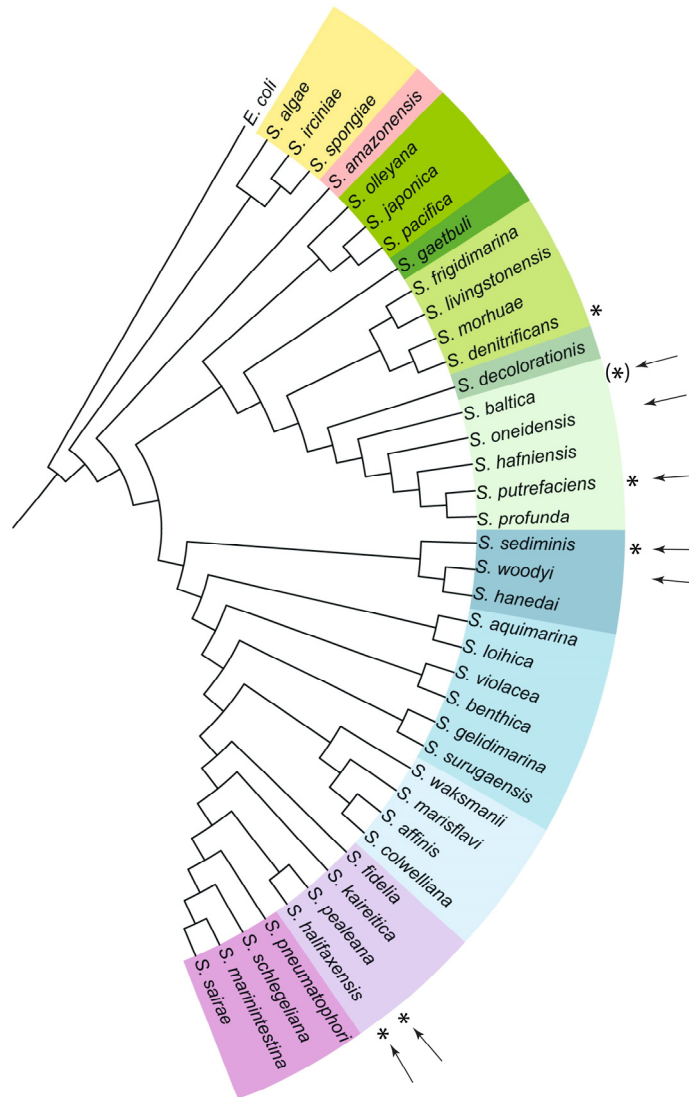


Abb. 8: Phylogenie von sequenzierten Typstämmen des Genus *Shewanella*.

Die phylogenetische Untersuchung des Genus zeigt in manchen Fällen einen Zusammenhang zwischen Verwandtschaft und natürlichem Habitat (Farbcode). Die monophyletische Zuordnung stößt jedoch nicht zuletzt in der Gruppe, in der sich auch *S. oneidensis* und *S. putrefaciens* befinden, an ihre Grenzen. In der genannten Gruppe existieren Vertreter, die in limnischen Habitaten (*S. oneidensis* MR-1), Brackwasser (*S. baltica*) und marinen Habitaten (z.B. *S. profunda*) vorkommen. Mit einem * sind Vertreter des Genus gekennzeichnet, welche ein putatives duales Flagellensystem besitzen. (*) bedeutet, dass nicht alle Spezies von *S. baltica* ein duales Flagellensystem besitzen: *S. baltica* OS155 und OS183 besitzen es, aber OS185, OS195 und OS223 nicht. *S. piezotolerans* WP3 und *S. sp.* W3-18-1 haben ebenfalls ein duales Flagellensystem, fehlen jedoch in dieser Abbildung aufgrund der späteren Entdeckung dieser Organismen. Mit Pfeilen sind die Stämme gekennzeichnet, welche ein putatives Gencluster für Flagellinmodifizierung besitzen. Die Sequenzen der 16S rRNA wurden auf eine Länge von etwa 1200 Bp getrimmt und mithilfe von ClustalW bioinformatisch abgeglichen. Der phylogenetische Baum mit dem ‚Neighbor-joining‘ Algorithmus wurde nach 1000 ‚bootstraps‘ mithilfe von PAUP berechnet. Die Visualisierung erfolgte online (<http://itol.embl.de/>) unter Verwendung des ‚Interactive Tree of Life‘ Programms [186] und unter Zuhilfenahme von *E. coli* als ‚outgroup‘. Modifiziert nach [110].

Flagellenfilament besteht in *S. oneidensis* MR-1 aus zwei Flagellinuntereinheiten, FlaB (Hauptflagellin) und FlaA (Nebenflagellin). Es konnte gezeigt werden, dass beide Flagelline modifiziert werden, was unter anderem ein Protein-Homolog zu PseB (NAD(P)-abhängige Dehydratase/Epimerase) aus *C. jejuni* involviert [398]. Die Modifizierung ist essentiell für eine

funktionelle Flagelle [398]. In einer Transposon-basierten Mutagenese in *S. oneidensis* MR-1 mit dem Ziel, biofilmrelevante Gene zu entdecken, wurde das Gencluster SO_3261 – 3265 entdeckt (persönliche Kommunikation Kai Thormann, Kim Dohlich). Die Gene dieses Genclusters bilden ein Operon und deren Genprodukte sind in die funktionelle Assemblierung der Flagelle und vermutlich in die Modifikation der Flagelline involviert [71].

Die polare Flagelle ist von essentieller Bedeutung für *S. oneidensis* MR-1, da sie in ihrer Funktion als Motilität-vermittelndes Organ, nicht zuletzt für das Auffinden redoxaktiver Oberflächen und deren Besiedlung eine entscheidende Rolle spielt [24, 359]. Auch für die anschließende Biofilmbildung ist eine funktionale Flagelle unerlässlich, was sich nicht nur auf die Präsenz eines Flagellenfilaments, sondern in besonderem Maße auch auf die Funktionalität der Flagellenrotation – und damit auf das Agieren der Statorsysteme – in diesem Organismus zurückführen lässt (unveröffentlicht, [42]). Neben zwei – teilweise kryptischen – Chemotaxis-systemen, deren Funktion unklar ist, existiert ein drittes, konserviertes Chemotaxisssystem in *S. oneidensis* MR-1, welches essentiell für ein gerichtetes Schwimmverhalten hin zu anaeroben Elektronenakzeptoren ist [24, 191]. Für mindestens 5 der 29 MCPs konnte ebenfalls eine Rolle für die Energietaxis von *S. oneidensis* MR-1 festgestellt werden [19].

Neben diesem hochinteressanten *Shewanella* Vertreter existieren viele weitere Spezies innerhalb dieses Genus, die über ein einfaches, polares Flagellensystem verfügen. Im Unterschied dazu stehen *Shewanella* spp., welche duale Flagellensysteme besitzen (vgl. Abb. 8), die Ähnlichkeiten zu den dualen Flagellensystemen von *V. parahaemolyticus*, bzw. *A. hydrophila* aufweisen. Die Verteilung der Präsenz dualer Flagellensysteme bei *Shewanella* lässt auf die Anwesenheit eines dualen Flagellensystems bei einem Vorfahren dieses Genus schließen, wobei das laterale System vermutlich bei vielen der bis dato sequenzierten Spezies verloren gegangen ist (vgl. Abb. 8). Diese Vermutung stützt die breite Verteilung der Präsenz eines dualen Flagellensystems über den phylogenetischen Verwandtschaftsbaum. Trotzdem ziehen einige Shewanellen einen Vorteil daraus, ein zweites Flagellensystem zu besitzen. *Shewanella piezotolerans* WP3, ein aus der Tiefsee isoliertes Bakterium, hat zwei Flagellensysteme, die jeweils unter verschiedenen Bedingungen exprimiert werden. So werden Gene für Komponenten des polaren Flagellensystems bei hohem Druck (20 MPa) stark transkribiert, während gleichzeitig die Transkription der Gene für das laterale Flagellensystem reprimiert wird. Das genau gegensätzliche Transkriptionsmuster ist bei niedriger Temperatur (4°C) zu beobachten [383]. Ein weiterer Organismus, dem im Verlauf dieser Arbeit die größte Beachtung geschenkt werden soll ist *Shewanella putrefaciens* CN-32. Dieser Organismus besitzt ebenfalls zwei Gencluster, die für ein duales Flagellensystem codieren könnten, welche auf Genomebene große Ähnlichkeit zu dem Flagellensystem von *S. piezotolerans* WP3 besitzen. In Voruntersuchungen konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass sich vermutlich das Regulationsmuster der Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 fundamental von dem in *S. piezotolerans* WP3 – aber vermutlich auch von dem Regulationsmuster der Paradigmenbeispiele dualer Flagellensysteme – unterscheidet [42].

1.5 Zielsetzung

Das Ziel meiner Doktorarbeit war es, 1.), grundlegende Erkenntnisse über Eigenschaften, Funktion und Nutzen des dualen Flagellensystems in *S. putrefaciens* CN-32 zu schaffen, und 2.), die Charakteristika der posttranslationalen Modifikation des polaren Flagelle von *S. oneidensis* MR-1 zu determinieren. Konkret gab es dabei folgende Fragestellungen:

1. a) Existieren zwei funktionale, eigenständige Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32?

Zu diesem Zweck wurden transkriptionelle Fusionen von Genen beider Flagellensysteme mit dem *luxCDABE* System konstruiert und deren Aktivität qualitativ und quantitativ ausgewertet. Des Weiteren wurden mikroskopische Analysen zur Überprüfung der Präsenz zweier distinkter Flagellentypen durchgeführt. Zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisation und Individualität der Flagellensysteme auf Basis einzelner Rotor- oder Motorkomponenten wurden entsprechende Proteine mit Fluorophoren fusioniert und die resultierenden Stämme nachfolgend Epifluoreszenz-mikroskopisch untersucht.

1. b) Welchen Einfluss hat das duale Flagellensystem auf die Motilität von *S. putrefaciens* CN-32?

Zu diesem Zweck wurden entsprechende Deletionsmutanten konstruiert und der Effekt auf die Bewegung in planktonischer Kultur, sowie in Soft-Agarplatten, ausgewertet. Schwimmassays in planktonischer Kultur ließen Aussagen über die Schwimmgeschwindigkeit einzelner Zellen zu.

1. c) Welchen Nutzen bringt ein sekundäres Flagellensystem für *S. putrefaciens* CN-32 und welche Rolle spielt das Chemotaxisssystem?

Um diese Frage zu beantworten wurden verschiedenartige Chemotaxisassays mit unterschiedlichen Bedingungen entworfen und durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels Deletionsmutanten des Chemotaxisystems die Rolle und die Spezifität des Chemotaxisystems in *S. putrefaciens* im Bezug auf beide Flagellensysteme aufgeklärt. Die Analyse von Stämmen mit Fluorophor-gekoppelten Chemotaxisproteinen, nebst der Co-Lokalisation mit Flagellenproteinen beider Flagellensysteme untermauerte die Aussage über die Spezifität des Chemotaxisystems.

2. a) Was sind die Charakteristika der Modifikation der Flagelline FlaA und FlaB von *S. oneidensis* MR-1?

Zur immunbiochemischen Visualisierung modifizierter und nicht-modifizierter Flagelline, wurden zunächst polyklonale Antikörper gegen die N-terminale Domäne von FlaA hergestellt. Aufreinigungen des gesamten nativen Flagellenfilaments war notwendig, um massenspektrometrische Analysen durchführen zu lassen (Kooperation mit Prof. Anne Dell (London, GB) und Prof. Parastoo Azadi (Georgia, USA)).

2. b) Welche Aminosäuren von FlaA und FlaB werden modifiziert?

Verschiedene massenspektrometrische Ansätze wurden durchgeführt, um die exakten Stellen der Modifikation von FlaA und FlaB zu determinieren. Die Richtigkeit wurde mit entsprechenden Aminosäuresubstitutionen überprüft.

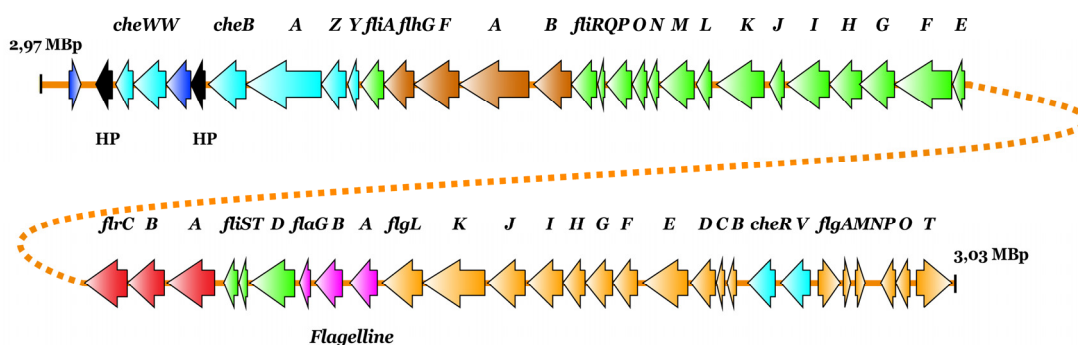
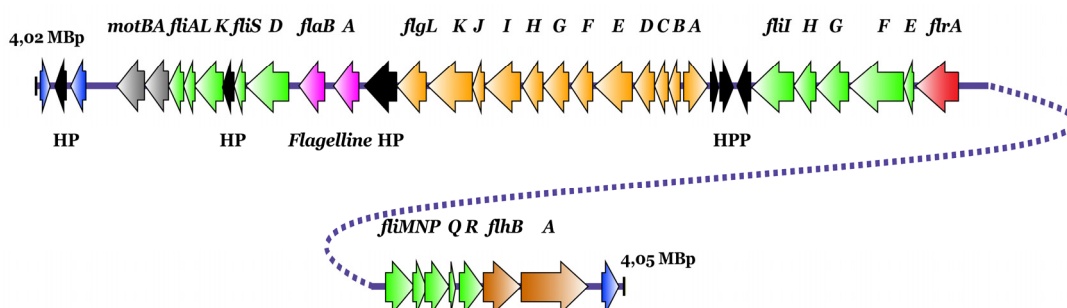
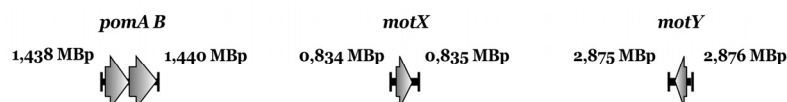
2 Ergebnisse

2.1 *Shewanella putrefaciens* CN-32 besitzt ein duales Flagellensystem

Genomische Analysen zeigten, dass *S. putrefaciens* CN-32 zwei Gencluster im Genom besitzt, deren Gene für zwei putative Flagellensysteme codieren. Die Anzahl der Mikroorganismen mit dualen Flagellensystemen vergrößert sich also um einige Vertreter der Familie der *Shewanellaceae*. Die bisherige Charakterisierung von dualen Flagellensystemen anderer Organismen fokussierte sich primär auf die Eigenschaften der Flagellen für die Motilität unter verschiedenen Bedingungen [225, 231, 383]. Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass Gene beider Flagellensysteme unter nährstoffreichen Bedingungen, während logarithmischen Wachstums in planktonischer Kultur, sowie auf Oberflächen exprimiert werden und für zwei verschiedene Flagellentypen codieren, die synergistisch zu effektivem Schwimmverhalten beitragen.

2.1.1 Zwei Gencluster für ein putativ duales Flagellensystem in *S. putrefaciens* CN-32

Beide im Genom von *S. putrefaciens* CN-32 vorliegenden, zusammenhängenden Genregionen, ähneln in ihrer Zusammensetzung bereits bekannten dualen Flagellensystemen, welche in anderen *Shewanella* spp., *Aeromonas* spp., oder *Vibrio* spp. vorliegen (vgl. Abb. 9 und Tabelle 15 im Appendix). Die 61 Gene umfassende Genregion (Sputcn32_2556 – Sputcn32_2605), die für die putativ polare Flagelle codiert, soll Cluster 1 genannt werden, die zweite Genregion (Sputcn32_3447 – Sputcn32_3485), deren 43 Gene für ein putativ laterales Flagellensystem codiert, soll unter dem Überbegriff Cluster 2 zusammengefasst werden. Zudem wurden unabhängig und monocistronisch im Genom liegende Gene für Statorelemente, namentlich *pomA* (Sputcn32_1278), *pomB* (Sputcn32_1279), bzw. Gene für Hilfsproteine, wie *motX* (Sputcn32_0748) und *motY* (Sputcn32_1601) identifiziert, deren Produkte in erster Linie aufgrund der Ähnlichkeit zu bekannten Statorelementen und Hilfsproteinen des polaren Flagellensystems von *S. oneidensis* MR-1 annotiert werden konnten. Innerhalb der Genregion Cluster 2 liegen weitere Gene, die für die Statoren MotA und MotB codieren. Cluster 1 ähnelt in seiner Genorganisation sehr dem Gencluster für das polare Flagellensystem in *S. oneidensis* MR-1 und umfasst zudem einen Teil der Chemotaxismaschinerie. Cluster 2 dagegen weist eher Ähnlichkeiten zu der Genregion für das sekundäre Flagellensystem in *Aeromonas hydrophila* oder *Shewanella piezotolerans* WP3 auf. Die Genorganisation von Cluster 1 und Cluster 2 ist tatsächlich nahezu identisch mit den Genregionen des bereits charakterisierten dualen Flagellensystems von *S. piezotolerans* WP3 [383]. Typische Gene, die in sekundären Flagellensystemen anderer Organismen nicht vorhanden sind, wie zum Beispiel *flbF*, *flbG*, *flgN*, *flgP*, *flgO*, *flgT*, *fliO* oder *fliB* und *fliC*, fehlen auch in Cluster 2 von *S. putrefaciens* CN-32. Bioinformatische Analysen (Protein-BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) zeigten, dass sich die Produkte der Orthologe beider Flagellencluster in ihrer Ähnlichkeit, bzw. Identität stark

A Cluster 1**B Cluster 2****C abseits liegende Statorgene****Abb. 9: Genregionen der Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32.**

A Genregion des polaren Flagellensystems (Cluster 1). **B** Genregion des lateralen Flagellensystems (Cluster 2). **C** Nicht mit den Clustern verbundene, abseits liegende Gene für Statoren des polaren Flagellensystems. Farbcodierung: *fli*-Gene sind grün, *flg*-Gene hellbraun, *flh*-Gene dunkelbraun und *fla*-Gene pink markiert. Die Hauptregulatoren (*flr*) sind rot markiert. Dem Chemotaxissystem zugehörige Gene sind hellblau markiert, die für Statoren codierenden Gene in grau. Dunkelblau markiert sind Gene für deren Genprodukte eine Funktion annotiert ist, jedoch kein Name existiert. Schwarz gekennzeichnet sind Gene, die für hypothetische Proteine (HP) codieren. Die Zahlen geben die Lage im Genom von *S. putrefaciens* CN-32 an.

unterscheiden (für eine detaillierte Auswertung siehe Tabelle 16 im Appendix). Im Mittel sind die orthologen Proteine beider Flagellencluster zu 39 % identisch, einige Proteine haben allerdings einen wesentlich höheren Identitätsgrad (z.B. FliI, 60 %), wogegen manche Proteine zu einem sehr geringen Grad identisch sind, z.B. FliM (17 %). Diese Indizien weisen stark darauf hin, dass in *S. putrefaciens* CN-32 ein sekundäres, putativ laterales Flagellensystem neben dem polaren Flagellensystem existiert. Der nächste Schritt war zu zeigen, ob und unter welchen Bedingungen die Gene der Flagellensysteme exprimiert werden. Experimente, die ich bereits vor meiner Doktorarbeit durchführte, deuteten darauf hin, dass Gene beider Flagellensysteme unter bestimmten Bedingungen gleichzeitig exprimiert werden [42].

2.1.2 Gene beider Flagellensysteme werden zeitgleich exprimiert

Um die Expression flagellenrelevanter Gene zu überprüfen und zu verfolgen, wurde ein lumineszenzbasiertes Reportersystem konstruiert [93], welches auf dem *luxCDABE*-Operon aus *Photobacterium luminescens* basiert. Dieses Reportersystem erlaubt es, die Expression von Genen in der Population einer wachsenden Kultur über einen längeren Zeitraum effizient und höchst sensitiv zu verfolgen und zu quantifizieren. Zur Quantifizierung der Expression wurden die Gene

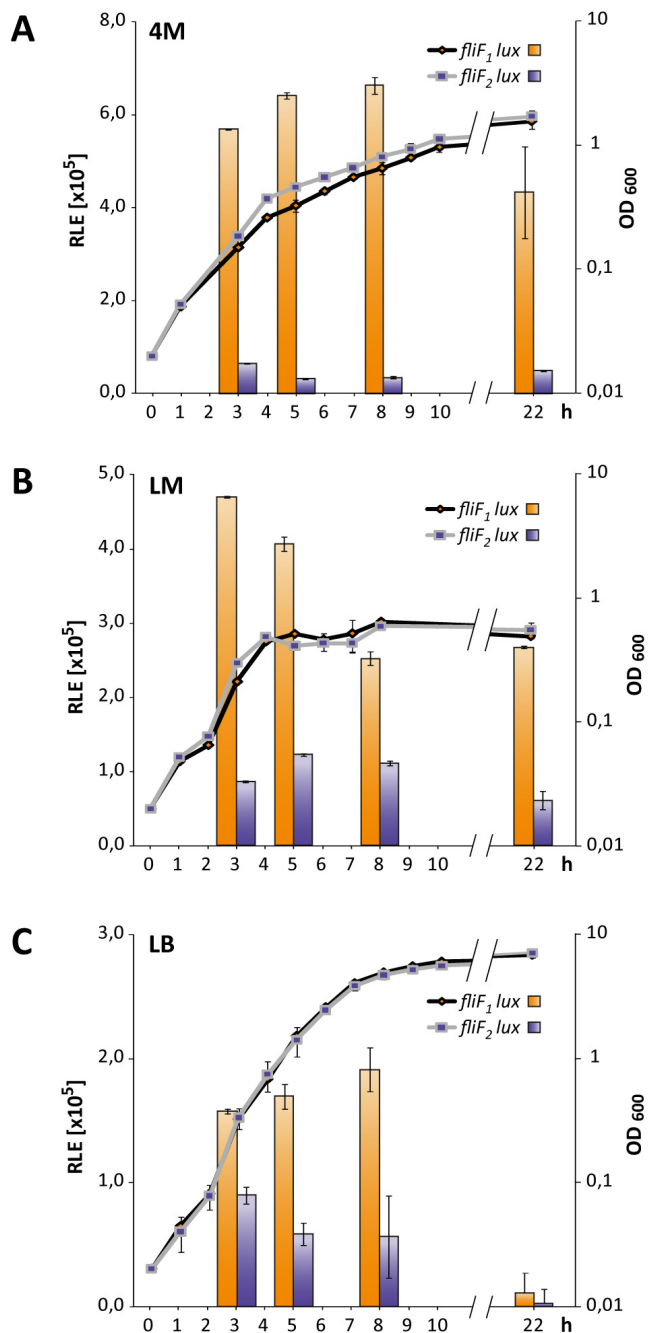


Abb. 10: Expression von *fliF1::luxCDABE* im Flagellencluster 1 und 2 im Bezug auf Medium und Wachstumsphase.

Stämme, die entweder eine transkriptionelle Fusion von *fliF1* oder *fliF2* mit dem *luxCDABE*-Operon tragen, wurden in verschiedenen Medien kultiviert (A, 4M Mineralmedium; B, LM verdünntes Komplexmedium mit Laktat; C, LB Vollmedium). Das Wachstum der Kultur wurde über die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt (*fliF1*: schwarz, *fliF2*: grau), während die Transkription indirekt über die Lichtemission (*fliF1*: orange, *fliF2*: lila) verfolgt wurde. Die Balken geben die relativen Lumineszenz-Einheiten (RLE) nach der Normalisierung auf die OD_{600} der Kultur wider. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 3 Replikaten.

*fliF*¹⁰ und *fliF*₂ gewählt, da deren Genprodukt eines der ersten strukturellen Komponenten des Flagellenrotors bildet und daher vermutlich mit der Präsenz eines Flagellensystems einhergeht.

Die transkriptionellen Analysen wurden in Mineralmedium (4M), verdünntem Komplexmedium mit Laktat (LM) und in Vollmedium (LB) durchgeführt und das Wachstum, wie auch die Lumineszenz, kontinuierlich verfolgt (vgl. Abb. 10). Die Expression von *fliF*₁ konnte in allen Medien nachgewiesen werden, was auf die Präsenz einer polaren Flagelle sowohl unter niedrigem Nährstoffangebot, als auch unter hohem Nährstoffangebot hinweist. Dabei war die Expression von *fliF*₁ in der exponentiellen Phase des Wachstums am stärksten. Auch auf Oberflächen wurde *fliF*₁ kontinuierlich exprimiert (Abb. 11).

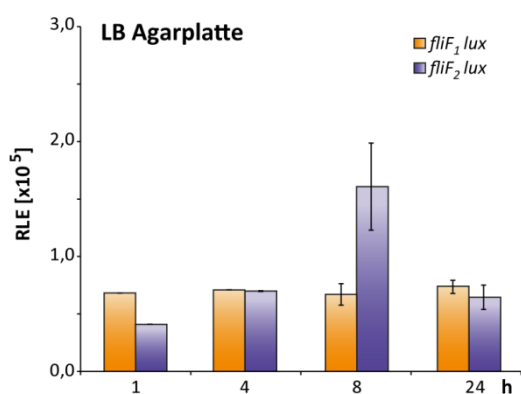


Abb. 11: Expression von *fliF*::*luxCDABE* im Flagellencluster 1 und 2 im Bezug auf das Wachstum auf einer Oberfläche.

Die Stämme *fliF*₁::*luxCDABE* und *fliF*₂::*luxCDABE* wurden jeweils auf vier individuellen LB-Agarplatten (1% Agar) inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten mit Medium abgeschwemmt und die Lumineszenz bestimmt. Die relative Lumineszenz (RLE) errechnet sich dabei aus der Normalisierung der Gesamtlumineszenz gegenüber der OD₆₀₀. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Wie bereits in anderen Organismen gezeigt werden konnte, hatte das Wachstum auf einer Oberfläche einen positiven Effekt auf die Transkription von *fliF*₂, wobei diese zunächst halb so hoch war, wie die von *fliF*₁, sich jedoch nach acht Stunden Wachstum auf der Oberfläche auf das doppelte der transkriptionellen Aktivität von *fliF*₁ verstärkte (Abb. 11). Interessanterweise konnte auch in planktonischer Kultur eine Expression von *fliF*₂ detektiert werden, sofern sich komplexe Medienbestandteile im Medium befanden (LM und LB) und sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase befand (vgl. Abb. 10B und C). Dies steht im starken Gegensatz zu den meisten anderen Organismen, deren laterale Flagellensysteme ausschließlich unter Bedingungen mit hoher Viskosität, oder auf Oberflächen produziert werden [16, 23, 48, 92, 145, 159, 160, 221, 225, 231, 342]. Die Expression von *fliF*₂ war hingegen in Mineralmedium nur auf einem basalen Level zu detektieren (vgl. Abb. 10A). Somit scheint die Expression von *fliF*₂ von der Wachstumsphase und der Zusammensetzung des Mediums abzuhängen. Weder das, anstelle von Laktat als C-Quelle zugegebene *N*-Acetylglucosamin (einem der wenigen Zucker, die *Shewanella* spp. verwerten können), noch lösliches Eisen konnte die Expression von *fliF*₂ stimulieren. Auch die Erhöhung der Viskosität des Mediums durch Glycerin hatte keinen positiven Effekt auf die Transkription von *fliF*₂. Damit ist das Regulationsmuster der Flagellensysteme von *S. putrefaciens* CN-32 grundlegend anders als bei allen bisher charakterisierten sekundären Flagellensystemen in anderen bakteriellen

¹⁰ Eine tiefgestellte 1 oder 2 hinter Gennamen bedeutet die Zugehörigkeit zum Flagellencluster 1 (polar) oder 2 (lateral)

Spezies. Der nächste Schritt war nun, die Präsenz zweier Flagellensysteme auf mikroskopischer Ebene durch Elektronenmikroskopie und Flagellenfärbung, gefolgt von Lichtmikroskopie nachzuweisen.

2.1.3 Präsenz eines dualen Flagellensystems

Zur Überprüfung der Präsenz zweier Flagellensysteme wurden zunächst definierte Deletionsmutanten erzeugt. Dazu wurde jeweils das gesamte Gencluster 1, bzw. das gesamte Gencluster 2, der Flagellensysteme über zweifach homologe Rekombination aus dem Genom von *S. putrefaciens* CN-32 entfernt. Die dadurch erzeugten Stämme werden als Δ cluster 1 und Δ cluster 2 bezeichnet. Ein nicht motiler Kontrollstamm Δ *fliF*_{1/2} wurde durch die Deletion von *fliF*₁ und *fliF*₂ in einem Stamm erreicht. Elektronenmikroskopische, sowie lichtmikroskopische Aufnahmen durch

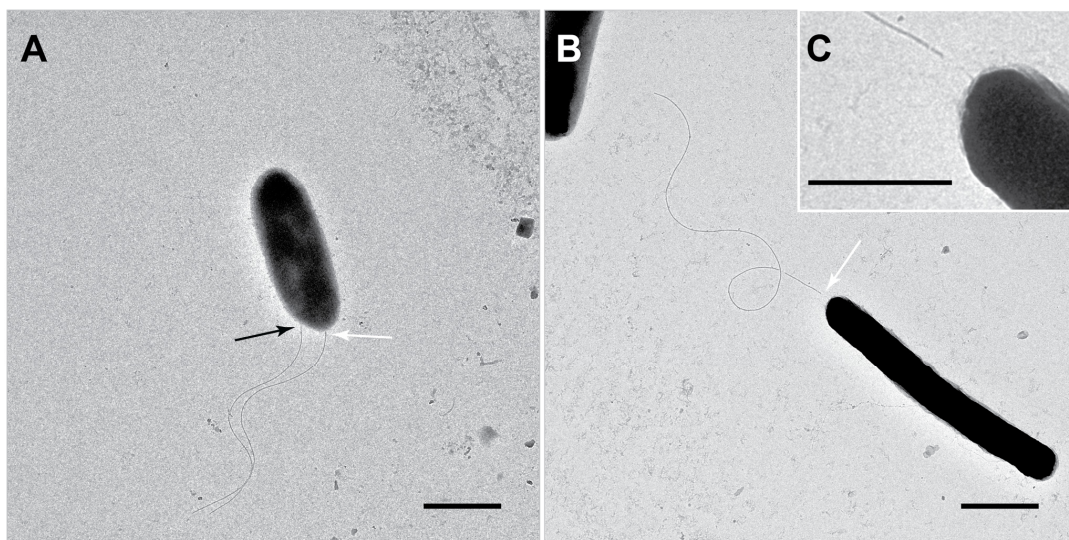


Abb. 12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Shewanella putrefaciens* CN-32.

Die Bilder stellen transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von logarithmisch in planktonischer Kultur gewachsenen *S. putrefaciens* CN-32 Zellen dar. **A** Zellen des Wildtyps zeigen eine polare Flagelle und ein oder zwei zusätzliche laterale Flagellen (in diesem Fall subpolar lokalisiert). **B** Dem Stamm Δ cluster 2 fehlt das Gencluster, welches für laterale Flagellen codiert und produziert ausschließlich polare Flagellen. **C** Die Teilaufnahme von **B** zeigt, dass die Flagelle nicht vom Zellkörper abgerissen ist. Die weißen Pfeile markieren polare Flagellen, der schwarze Pfeil markiert eine, in diesem Fall subpolar lokalisierende, laterale Flagelle. Die Balken in **A** und **B** repräsentieren die Größe von 1 μ m, der Balken in **C** hat die Abmessung von 500 nm. (Bild: Andreas Klingl)

Flagellenfärbung behandelter Zellen, zeigten, dass *S. putrefaciens* CN-32 in planktonischer Kultur zum Großteil eine polare Flagelle und eine kleinere Subpopulation an Zellen zusätzlich ein bis zwei zufällig¹¹ lokalisierte laterale Flagellen besitzt (vgl. Abb. 12A und Tabelle 3). Die Δ cluster 1 Mutante war nur zu einem sehr geringen Teil flagelliert und motil (vgl. Tabelle 3), während die Δ cluster 2 Mutante ausschließlich polare Flagellierung ausprägte (vgl. Abb. 12B, C und Tabelle 3).

¹¹ Der Terminus ‚zufällig‘ an dieser Stelle soll keine Aussage über die tatsächliche Zufälligkeit der Lokalisation der lateralen Flagellen sein, sondern nur die scheinbare Zufälligkeit – in Ermangelung des Wissens über eine Determinante der Lokalisation der lateralen Flagellen – zum Ausdruck bringen.

Tabelle 3: Flagellierung und Motilität von *S. putrefaciens* CN-32 in planktonischer Kultur. Dargestellt sind die Auswertungen von mindestens 100 Zellen pro Stamm in Prozent.

Charakteristikum	Wildtyp	Δ cluster 1	Δ cluster 2	Δ fliF _{1/2}
Flagellierung	49 % polar ≤ 12 % lateral (1 oder 2)	≤ 0,01 %	51 %	0 %
Motile Zellen in der Population	52 %	≤ 0,01 %	43 %	0%

2.1.4 Einfluss der Flagellensysteme auf die Motilität

Nachdem nun erfolgreich die Präsenz eines dualen Flagellensystems in *S. putrefaciens* CN-32 gezeigt wurde, sollte nachfolgend getestet werden, welche Rolle die Flagellensysteme für die Motilität von *S. putrefaciens* CN-32 spielen. Dazu werden Motilitätsassays in Weichagarplatten durchgeführt, die eine geringe Agarkonzentration (0,2 – 0,4 %) besitzen. Diese Platten werden mit einem Tropfen (3 μ l) Bakterienkultur angeimpft. Die Bakterien schwimmen in den Agar hinein und dem, durch das Zellwachstum entstehenden, Nährstoffgradienten entgegen. Die kreisförmige Ausbreitung, die durch das Schwimmen und das Wachstum der Zellen bedingt ist, kann dann ausgewertet werden.

Zur Analyse des Einflusses der Flagellensysteme auf die Motilität wurden die oben genannten Stämme Δ cluster 1, Δ cluster 2 und Δ fliF_{1/2} verwendet. Ihre Motilität im Vergleich zum Wildtyp und zusätzlich vergleichend auf Basis drei verschiedener Medien wurde anschließend dokumentiert (vgl. Abb. 13).

Die verstärkte Expression von fliF₂ auf Oberflächen ließ zunächst vermuten, dass laterale Flagellen – wie es für viele Spezies mit dualen Flagellensystemen zutrifft – von *S. putrefaciens* CN-32

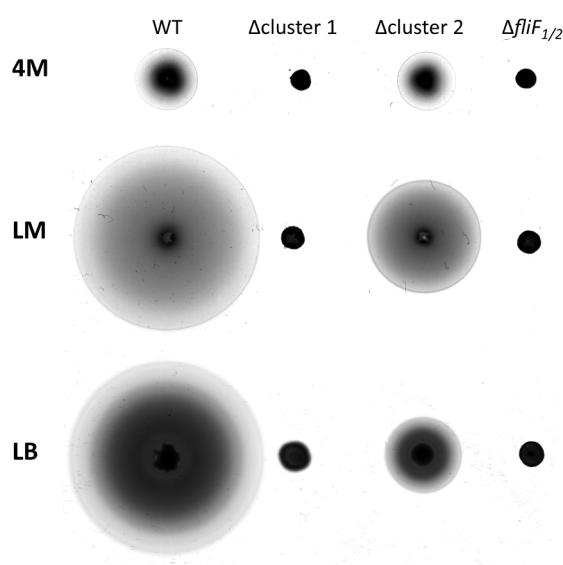


Abb. 13: Einfluss der Flagellensysteme auf die Motilität von *S. putrefaciens* CN-32.

Die Motilität des Wildtyps wurde mit den gezeigten Deletionsstämmen verglichen. Die Motilität wurde in Mineralmedium (4M), verdünntem Komplexmedium mit Laktat (LM) und in Vollmedium (LB) durchgeführt. Die Agarkonzentration lag bei 0,25 %. Die Schwimmradien wurden nach einer Inkubationszeit von 16 h dokumentiert.

ebenfalls benötigt werden, um über Oberflächen schwärmen zu können. Es wurde eine Reihe verschiedener Bedingungen getestet (Temperatur, Medienzusammensetzung, Agarkonzentration), jedoch konnte zu keiner Zeit ein Schwärmen über eine Oberfläche beobachtet werden (nicht gezeigt).

Die Motilität wurde zunächst über die radiale Ausbreitung in Weichagarplatten und anschließend über die Messung der Geschwindigkeiten einzelner Zellen in planktonischer Kultur bestimmt. Dabei diente $\Delta\text{fliH}_{1/2}$ als ein Kontrollstamm und zeigte – da flagellenlos – wie zu erwarten keinerlei Motilität in allen drei Medien in Weichagarplatten oder in planktonischer Kultur. Generell zieht die Deletion des Flagellenclusters 1 einen schwerwiegenden Motilitätsphänotyp in Weichagarplatten nach sich. Eine $\Delta\text{cluster 1}$ -Mutante war in Mineralmedium (4M) nicht motil, während in komplexeren Medien (LM und LB) ein stark verringerter Schwimmradius zu beobachten war. In Mineralmedium war die Motilität einer $\Delta\text{cluster 2}$ -Mutante nicht eingeschränkt, was in hervorragender Weise zu den Transkriptionsanalysen passt, die zeigten, dass Gene des

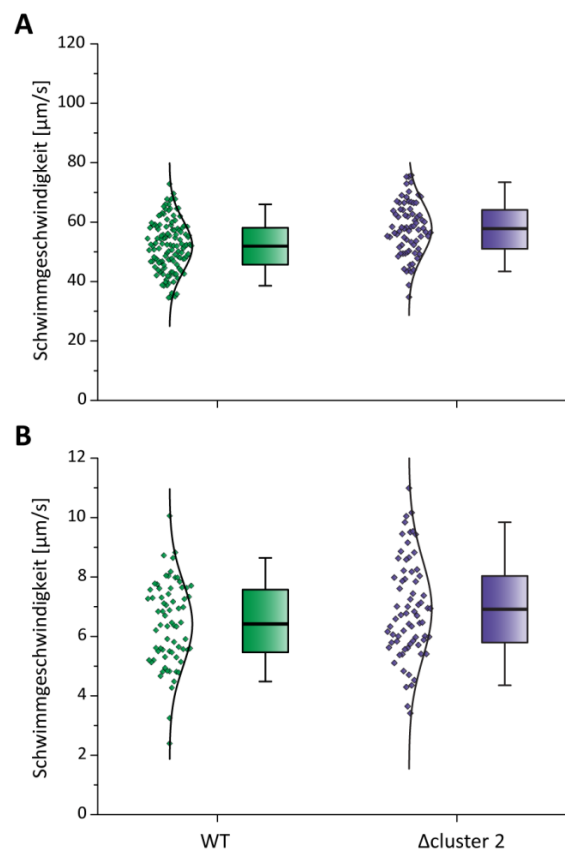


Abb. 14: Schwimmgeschwindigkeiten von *S. putrefaciens* CN-32 in planktonischer Kultur.

Die Schwimmgeschwindigkeit einzelner, in die logarithmische Phase gewachsener planktonischer Zellen des Wildtyps und der $\Delta\text{cluster 2}$ Mutante in Vollmedium (LB) mit niedriger (A), oder hoher (B) Viskosität (LB mit Glycerin, 50 % Glycerin v/v) wurde über die zurückgelegte Strecke pro Zeiteinheit zwischen aufgenommen Bildern mithilfe des Programms Metamorph gemessen und als ‚Boxplot‘ dargestellt. A Bei niedriger Viskosität beträgt die mittlere Schwimmgeschwindigkeit (Balken) des Wildtyps $51,9 \pm 8,6 \mu\text{m/s}$, die der $\Delta\text{cluster 2}$ -Mutante $57,8 \pm 8,9 \mu\text{m/s}$. B Die mittlere Schwimmgeschwindigkeit bei hoher Viskosität beträgt für den Wildtyp $6,4 \pm 1,4 \mu\text{m/s}$ und für die $\Delta\text{cluster 2}$ -Mutante $6,9 \pm 1,6 \mu\text{m/s}$. Die Box umfasst 75 % der einzelnen Datenpunkte (≥ 70 einzelne Messungen, jeweils linkerhand des Boxplots).

lateralen Flagellensystems in Mineralmedium vermutlich nur basal transkribiert werden (vgl. Abb. 10). Allerdings wurde der Phänotyp einer Δ cluster 2-Mutante – bezogen auf die Größe des Schwimmradius – ausgeprägter, je größer der Bestandteil komplexer Medienkomponenten im Medium wurde (LM < LB). Demnach scheint sowohl die polare Flagelle, als auch das laterale Flagellensystem gleichzeitig zum Schwimmen in Weichagarplatten beizutragen, wenn komplexe Medienbestandteile vorhanden sind.

In planktonischer Kultur nahmen die lateralen Flagellen jedoch interessanterweise keinen Einfluss auf die Schwimmgeschwindigkeit einzelner Zellen, weder bei niedriger, noch bei hoher Viskosität (s. Abb. 14). Während der Wildtyp in Medium mit niedriger Viskosität (LB) mit einer Geschwindigkeit von $51,9 \pm 8,6 \mu\text{m/s}$ und in Medium mit hoher Viskosität (LB mit Glycerin, 50 % v/v) mit einer Geschwindigkeit von $6,4 \pm 1,4 \mu\text{m/s}$ schwamm, war die Geschwindigkeit der Δ cluster 2-Mutante mit $57,8 \pm 8,9 \mu\text{m/s}$, bzw. $6,9 \pm 1,6 \mu\text{m/s}$ mit der Schwimmgeschwindigkeit des Wildtyps vergleichbar, aber sogar etwas höher. Somit scheint die polare Flagelle zu genügen, um die volle Schwimmgeschwindigkeit in flüssigen Medien zu erreichen. Sehr selten wurden auch schwimmende Zellen der Δ cluster 1-Mutante beobachtet. Diese bewegten sich jedoch sehr langsam fort und schwammen häufig den Zellkörper drehend im Kreis (nicht gezeigt). Dies lässt sich vermutlich auf die laterale Lokalisation einzelner sekundärer Flagellen zurückführen.

2.2 Lokalisation und Spezifität der Flagellensysteme

In jüngerer Vergangenheit wurde gezeigt, dass Stator Komponenten (MotAB), aber auch Rotorkomponenten (FliN, FliM) dynamisch und während der Funktion des Flagellenapparates ausgetauscht werden können [64, 86, 180]. Zwei Flagellensysteme, die auf Proteinebene und Struktur einen hohen Grad an Ähnlichkeit aufweisen und zudem parallel agieren, könnten daher strukturelle Komponenten – wie z.B. Statoren, oder Rotorkomponenten – teilen. Tatsächlich konnte eine massenspektrometrische Analyse von Basalkörpern der polaren Flagelle des Korallenpathogenen Organismus *Vibrio shilonii* belegen, dass ein Rotorprotein der polaren Flagelle in einem anderen Flagellengencuster codiert wird, welches Ähnlichkeiten zu den lateralen Flagellensystemen von *V. parahaemolyticus* und *A. hydrophila* aufweist [96]. Auch in *Azospirillum brasilense* existieren Tn5-Transposonmutanten mit Insertionen in einzelnen Genen, denen sowohl die polaren, als auch die lateralen Flagellen fehlen, was ebenso auf Flagellenkomponenten schließen lässt, die für beide Flagellensysteme gleichermaßen strukturelle oder regulatorische Aufgaben erfüllen könnten [239]. Es existieren folglich komplexe Flagellensysteme, die synchron assembliert werden und über das Zusammenspiel von Proteinen unterschiedlicher Flagellensystem-Zugehörigkeit funktionieren. Hier sollte nun gezeigt werden, dass beide, parallel existierende Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 auf struktureller Ebene hochspezifisch sind, jedoch im Bezug auf die regulatorische Ebene durchaus Interaktion aufweisen.

2.2.1 Die Spezifität des C-Ring Proteins FliM

Nachdem nun der Beweis erbracht war, dass beide Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 nicht nur zeitgleich transkribiert werden, sondern auch zeitgleich funktionieren, stellte sich die Frage, ob beide Flagellensysteme eine strukturelle Spezifität aufweisen, oder ob Komponenten von beiden Flagellensystemen geteilt werden. Da FliM als dynamisches Rotorprotein bekannt war, entschied ich mich für dieses Protein, um die Spezifität der Flagellensysteme genauer zu untersuchen. Markerlose Deletionen von *fliM₁* oder *fliM₂* wiesen einen vergleichbaren Phänotyp mit den entsprechenden Deletionen der Flagellencluster 1, bzw. 2 auf (vgl. Abb. 15B), was dem Verlust der Funktion der polaren, bzw. der lateralen Flagellen entspricht. Interessanterweise zeigte die Δ cluster 2-Mutante eine stärker reduzierte radiale Ausbreitung als eine Δ *fliM₂*-Mutante. Die Motilität der Δ *fliM₁*-Mutante war ebenfalls drastisch reduziert, wenn auch der Schwimmradius deutlich größer war, als der einer Δ cluster 1-Mutante. Diese Unterschiede in der Schwere des Phänotyps sind vermutlich regulatorischen Ursprungs und sollen in Kapitel 2.2.3 näher beleuchtet werden.

Um FliM nun intrazellulär zu visualisieren, erstellte ich zunächst Konstrukte, in denen sowohl FliM₁, als auch FliM₂ funktional über einen 6-fach Glycinlinker C-terminal mit eCfp (*enhanced Cfp*) [354], Venus (Yfp-Derivat) [354], sfGfp (der *„superfolder“* Version von Gfp) [271] oder

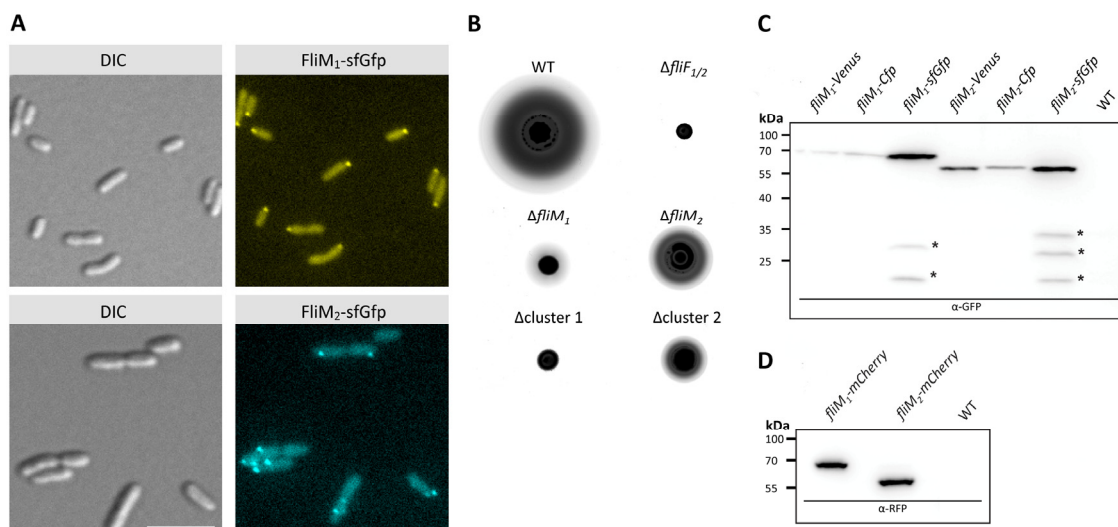


Abb. 15: Lokalisation von FliM₁ und FliM₂ und deren Einfluss auf die Motilität in *S. putrefaciens* CN-32.

A Logarithmisch in LB wachsende *S. putrefaciens* CN-32 Zellen, die entweder FliM₁-sfGfp (Falschfarbe: gelb), oder FliM₂-sfGfp (Falschfarbe: cyan) produzieren, wurden epifluoreszenzmikroskopisch untersucht. Gezeigt sind die DIC-Aufnahmen (links) und Fluoreszenzbilder (rechts) (DIC: engl.: *different interference contrast*). Der Balken hat eine Abmessung von 5 μ m. **B** Vergleichender Motilitätsassay der Stämme Δ *fliM₁* und Δ *fliM₂* mit Δ cluster 1 und Δ cluster 2. Die Agarkonzentration lag bei 0,25 %. Die Schwimmradien wurden nach einer Inkubationszeit von 16 h dokumentiert. **C** Test der Stabilität der Fluorophor-gekoppelten Versionen von FliM₁ und FliM₂ mit Gfp-Derivaten. Die Proteinfusionen FliM₁- bzw. FliM₂-Venus, -eCfp oder -sfGfp wurden mittels Immunoblot-Verfahren detektiert. Als Antikörper diente ein Gfp-spezifischer Antikörper (Roche, Penzberg). Als Negativkontrolle diente der Wildtyp (keine sichtbare Bande) und als Positivkontrolle wurde ein *S. oneidensis* MR-1 Stamm verwendet, welcher konstitutiv eGfp produziert. Schwache Degradation wurde nur für FliM₁-sfGfp und FliM₂-sfGfp detektiert (*). **D** Test der Stabilität der Fluorophor-gekoppelten Versionen von FliM₁ und FliM₂ mit mCherry. Ein mCherry (RFP)-spezifischer Antikörper wurde zur Detektion von FliM₁-mCherry und FliM₂-mCherry verwendet. Es konnte keine Degradation der Fusionsproteine detektiert werden. Das Proteinisolat des Wildtyps zeigte keine sichtbare Bande.

mCherry verbunden sind. Die Funktion von FliM₁ war dabei lediglich für die Fusionen mit eCfp und sfGfp gegenüber dem Wildtypprotein eingeschränkt (vgl. Abb. 38 im Appendix). Des Weiteren waren alle erstellten Konstrukte von FliM₁ und FliM₂ stabil, mit Ausnahme einer leichten Instabilität, die für die sfGfp-Konstrukte beobachtet wurde (vgl. Abb. 15C). Mikroskopische Analysen zeigten, dass eine Subpopulation von etwa 60 % der Zellen FliM₁-sfGfp produzierte, welches in allen Fällen unipolar am ‚alten‘ Pol der Zelle lokalisierte, also dort, wo auch das polare Flagellenfilament lokalisiert (Abb. 15A). Eine fluoreszenzbasierte Co-Lokalisation war nicht möglich, da gängige Proteinfärbungen – wie beispielsweise NanoOrange® (Invitrogen, Karlsruhe) – zwar Zellkörper anfärbten, jedoch nicht das Filament sichtbar machen konnten (nicht gezeigt), was vermutlich auf eine Modifizierung der polaren Flagelle von *S. putrefaciens* CN-32 zurückzuführen ist. FliM₂-sfGfp wurde in einer Subpopulation von etwa 50 % der Zellen produziert und lokalisierte an verschiedenen Positionen innerhalb der Zellen (durchschnittlich zwei fluoreszente Foci pro Zelle), gelegentlich auch subpolar, oder polar (vgl. Abb. 15A). Diese Beobachtung stimmt mit der

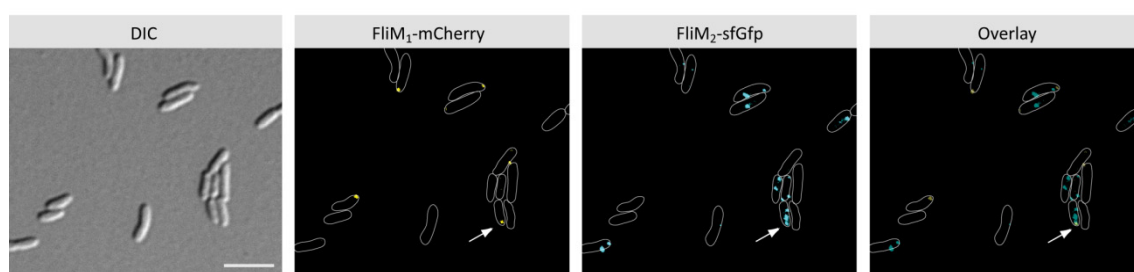


Abb. 16: Co-Lokalisation von FliM₁ und FliM₂.

Links ist die lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) logarithmisch in LB gewachsener Zellen zu sehen, die *fliM₁-mCherry* und *fliM₂-sfGfp* exprimieren. Fluoreszente Foci von FliM₁-mCherry sind in der Falschfarbe gelb dargestellt, FliM₂-sfGfp in cyan. Rechts ist die Überlagerung des mCherry- und des Gfp-Fluoreszenzkanals zu sehen (Overlay). Der weiße Pfeil zeigt auf potentiell co-lokalisierende FliM₁-mCherry und FliM₂-sfGfp Fusionsproteine. Der Balken hat die Abmessung von 5 µm.

gelegentlichen subpolaren Lokalisation der lateralen Flagellen überein (vgl. Abb. 12). Eine polare Lokalisation von FliM₂ ließ jedoch die Hypothese zu, dass FliM₂ mit dem Basalkörper der polaren Flagelle interagiert und somit eine aus zwei verschiedenen Flagellensystemen codierte, komplexe Flagelle gebildet werden könnte. Um diese Hypothese zu testen wurde zunächst ein Stamm erstellt, welcher zugleich *fliM₁-mCherry* und *fliM₂-sfGfp* im Genom trägt. Der daraus resultierende Stamm ermöglichte es, Co-Lokalisationsstudien mit FliM₁ und FliM₂ durchzuführen. In der Tat co-lokalisieren FliM₁-mCherry und FliM₂-sfGfp in etwa 12 % der Zellen, die beide Proteinfusionen gleichzeitig produzierten (vgl. Abb. 16, Tabelle 4). Dieser Hinweis auf eine mögliche Interaktion von FliM₁ und FliM₂ wurde zusätzlich durch FRET-Mikroskopie (engl.: *fluorescence resonance energy transfer*) überprüft, was in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Victor Sourjik in Heidelberg geschah, jedoch ließ sich kein Hinweis darauf erbringen, dass eine Interaktion zwischen FliM₁ und FliM₂ stattfindet. Eine Deletion des jeweils anderen FliM in einem Stamm, welcher entweder FliM₁-sfGfp, oder FliM₂-sfGfp produziert, hatte keinen Einfluss auf das Lokalisationsmuster. Somit scheinen beide Flagellensysteme bezüglich der getesteten strukturellen Rotorkomponenten höchst spezifisch für ihr jeweiliges Flagellensystem zu sein.

2.2.2 Die Spezifität der Motorkomponenten

Vier Gene für Statorkomponenten, *pomAB* und *motAB*, bzw. zwei Gene für Hilfsproteine, *motX* und *motY*, sind im Genom von *S. putrefaciens* CN-32 vorhanden. Während die Gene *motAB* innerhalb des Flagellenclusters 2 liegen, sind *pomAB*, *motX* und *motY* außerhalb der Flagellencluster im Genom verteilt (vgl. Abb. 9). Um eine detaillierte Aussage über die Lokalisation und Spezifität der Motorkomponenten zu bekommen, fusionierte Susanne Brenzinger im Rahmen ihrer Masterarbeit sfGfp oder mCherry an die N-Termini von PomB oder MotB. Die anschließende Co-Lokalisation mit FliM₁ und FliM₂ zeigte, dass PomB vornehmlich mit FliM₁ und MotB mit FliM₂ co-lokalisiert (vgl. Tabelle 4). Des Weiteren hatte ein Stamm, in dem sowohl Cluster 2, als auch *pomAB* deletiert wurde, einen nicht-motilen Phänotyp, der durch die Expression von *motAB* nicht

Tabelle 4: Co-Lokalisation der Rotor- und Motorkomponenten in *S. putrefaciens* CN-32 Zellen, die beide Komponenten gleichzeitig exprimieren. Die Auswertung der Co-Lokalisation von FliM₁ und FliM₂ mit PomB und MotB wurde von Susanne Brenzinger durchgeführt. (n.b.=nicht bestimmt)

	FliM ₁	FliM ₂	PomB	MotB
FliM ₁	n.b.	12 %	95 %	17 %
FliM ₂	12 %	n.b.	25 %	89 %

komplementiert werden konnte. Entsprechend war auch ein Stamm in dem sowohl Cluster 1, als auch *motAB* im Flagellencluster 2 deletiert wurde, nicht motil, was dafür spricht, dass PomAB nur mit dem polaren Flagellensystem interagieren kann, und somit auch den Phänotyp nicht zu komplementieren vermag (Susanne Brenzinger, nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Statorkomplex PomAB spezifisch für das polare Flagellensystem ist, während die lateralen Flagellen ausschließlich mit dem Statorkomplex MotAB funktionieren. Außerdem konnte Susanne Brenzinger zeigen, dass in *S. putrefaciens* CN-32 PomAB spezifisch mit Na⁺-Ionen und MotAB spezifisch mit H⁺-Ionen betrieben werden [37, 43]. Zwei weitere Motorkomponenten, MotX und MotY, die zusammen den T-Ring der Flagelle ausmachen, existieren in *S. putrefaciens* CN-32. Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erstellte Natalie Windel funktionelle und stabile Fluorophorfusionen von MotX und MotY mit mCherry (Abb. 17C und D). Zusätzlich führte sie markerlose Deletionen von *motX* und *motY* in den Wildtyp, $\Delta pomAB$ und $\Delta cluster\ 2$ ein, mit dem Ziel die Spezifität dieser Motorkomponenten für die Flagellensysteme zu zeigen [397]. Eine Deletion von *motX* im genetischen Hintergrund von $\Delta pomAB$ entsprach dem Motilitätsphänotyp einer $\Delta motX$ -Mutante, was gleichermaßen für *motY* zutraf (vgl. Abb. 17A). Dagegen zerstörte eine Deletion von *motX* oder *motY* die Motilität in einer Mutante, in der zusätzlich das Flagellencluster 2 fehlte (vgl. Abb. 17A). Dieses Ergebnis wurde von der strikt polaren Lokalisation von MotX-mCherry und MotY-mCherry untermauert (vgl. Abb. 17B).

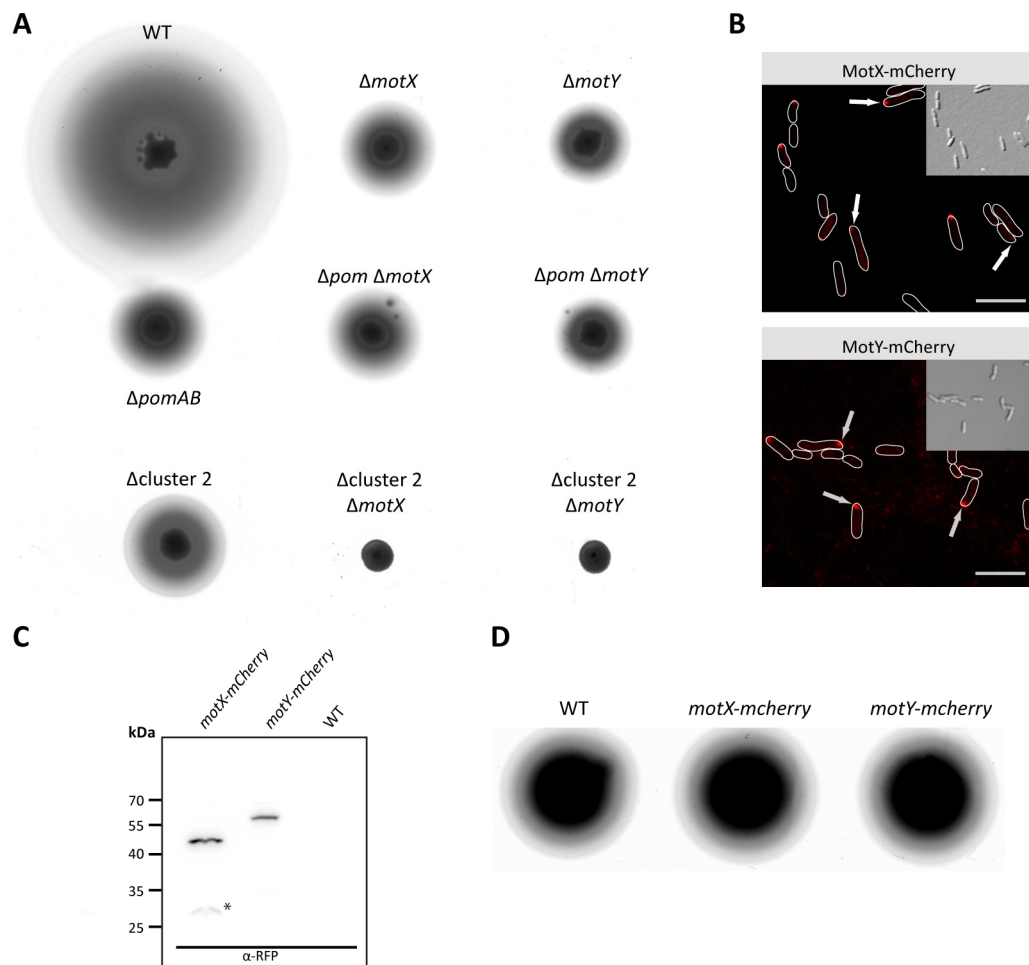


Abb. 17: Lokalisation und Funktion von MotX und MotY.

A Schwimmphänotyp verschiedener *motX* oder *motY* Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp. 3 μ l logarithmisch in planktonischer Kultur gewachsener Stämme mit entsprechenden ‚in frame‘ Mutationen von *motX* und *motY* wurden auf Weichagarplatten (0,25 % Agar) aufgetropft und nach 16 h Inkubation ausgewertet. **B** Lokalisation von MotX-mCherry und MotY-mCherry. Stämme mit einer genomisch integrierten Version von *motX*-mCherry, oder *motY*-mCherry wurden bis in die logarithmische Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Weiße Pfeile zeigen jeweils auf am Pol lokalisierende Fluoreszenzproteine. Die Balken entsprechen einer Größe von 5 μ m. **C** Die Stabilität der Proteinfusionen von MotX-mCherry und MotY-mCherry wurde unter Verwendung eines mCherry (RFP)-spezifischen Antikörpers mittels Immunoblot-Analyse überprüft. Schwache Degradation wurde lediglich für MotX-mCherry festgestellt. **D** Jeweils 3 μ l logarithmisch gewachsener Kulturen der Stämme *motX*- und *motY*-mCherry wurden neben dem Wildtyp 16 h in einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Agar inkubiert und anschließend die radiale Ausbreitung dokumentiert. Keiner der Fusionsprotein-Stämme war gegenüber dem Wildtyp bezüglich der Motilität eingeschränkt.

Zusammen demonstrieren diese Ergebnisse, dass sowohl MotX, als auch MotY für die Funktion der polaren Flagelle essentiell sind und nicht mit dem sekundären Flagellensystem interagieren.

2.2.3 Regulatorische Interaktion der Flagellensysteme

Wie zuvor erwähnt, wurden Unterschiede zwischen Phänotypen festgestellt, die auf einer Funktionsstörung der polaren oder lateralen Flagelle beruhen. So schwimmt eine Mutante mit einer

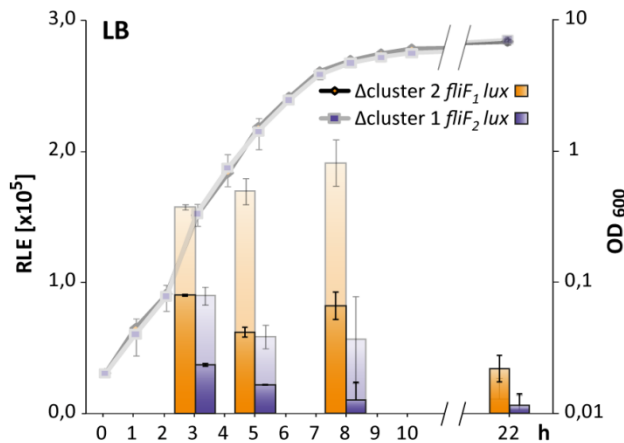


Abb. 18: Regulatorischer Einfluss der Deletion von Cluster 1 oder Cluster 2 auf die Transkription von *fliF::luxCDABE*.

Die Stämme Δ cluster 2 *fliF*₁::*luxCDABE*, bzw. Δ cluster 1 *fliF*₂::*luxCDABE* wurden in LB Medium kultiviert. Die Transkription wurde indirekt über die Lichtemission (*fliF*₁: orange, *fliF*₂: lila) gemessen und mit der Transkription im Wildtyp Hintergrund verglichen (blasser Farben, vgl. Abb. 10C). Die Balken geben die relativen Lumineszenz-Einheiten (RLE) nach der Normalisierung auf die OD₆₀₀ der Kultur wider. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Deletion von *fliM*₁ besser, als eine Mutante, der das gesamte Flagellencluster 1 fehlt (vgl. Abb. 15). Ähnliches trifft ebenfalls für *fliM*₂ und Δ cluster 2 zu. Aus diesem Grund erstellte ich die Stämme Δ cluster 1 *fliF*₂::*luxCDABE* und Δ cluster 2 *fliF*₁::*luxCDABE*, um die Expression von *fliF*, dessen Genprodukt den Grundstein des Flagellen-Basalkörpers darstellt, in Abhängigkeit zur Präsenz des jeweils anderen Flagellenclusters zu bestimmen. Die Auswertung der Lumineszenz-Messungen ergab, dass in Abwesenheit von Cluster 2, *fliF*₁ während des logarithmischen Wachstums, verglichen mit dem Wildtyp Hintergrund, um den Faktor 2 reduziert exprimiert wird (vgl. Abb. 18). Die Expression von *fliF*₂ verringert sich in Abwesenheit des Flagellenclusters 1 etwa um den Faktor 3. Dies könnte bedeuten, dass sich innerhalb der Flagellencluster regulatorische Elemente befinden, die Einfluss auf die Expression des jeweils anderen Flagellensystems nehmen. Im Gegensatz dazu beeinflusst das Fehlen von *fliF*₁ oder *fliF*₂ die Expression des jeweils anderen *fliF*-Gens nicht (nicht gezeigt). Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit bearbeitete Stefanie Gasch diese Thematik und konnte den putativen Masterregulator des polaren Flagellensystems FlrA₁ als ein mögliches regulatorisches Element enttarnen, welches Einfluss auf die Expression des sekundären Flagellensystems nimmt (Stefanie Gasch, unveröffentlicht).

2.3 Nutzen und Funktion eines dualen Flagellensystems in *S. putrefaciens* CN-32

Die bislang durchgeführten Experimente lassen darauf schließen, dass die zwei Flagellensysteme, die auf struktureller Ebene hochspezifisch sind, sich jedoch auf regulatorischer Ebene gegenseitig positiv beeinflussen, synchron zusammenarbeiten, um ein effektives Schwimmverhalten von *S. putrefaciens* CN-32 zu erreichen. Dagegen steht die Erkenntnis, dass das sekundäre Flagellensystem auf Einzelzellebene nicht zur erhöhten Geschwindigkeit des Schwimmens beiträgt – und zwar unabhängig von der Viskosität des Mediums. Daher kam die Frage auf, welchen Nutzen ein kostspieliges duales Flagellensystem für *S. putrefaciens* CN-32 hat und welche Rolle insbesondere das sekundäre Flagellensystem übernimmt, um in einer synergistischen Art und Weise mit dem polaren Flagellensystem zu agieren. Die Untersuchungen der Motilität in Weichagarplatten deuteten bereits auf einen positiven Effekt des sekundären Flagellensystems hin

(vgl. Abb. 13). Tatsächlich konnte ich in einem Stamm, dessen natives FliM_2 durch ein chromosomal integriertes $\text{FliM}_2\text{-sfGfp}$ ersetzt wurde, eine Veränderung bezüglich der Heterogenität der Produktion von $\text{FliM}_2\text{-sfGfp}$ in der Population beobachten. Dazu nahm ich Proben aus dem inneren und äußeren Bereich des Schwimmradius eines $\text{fliM}_2\text{-sfGfp}$ Stammes. Erstaunlicherweise

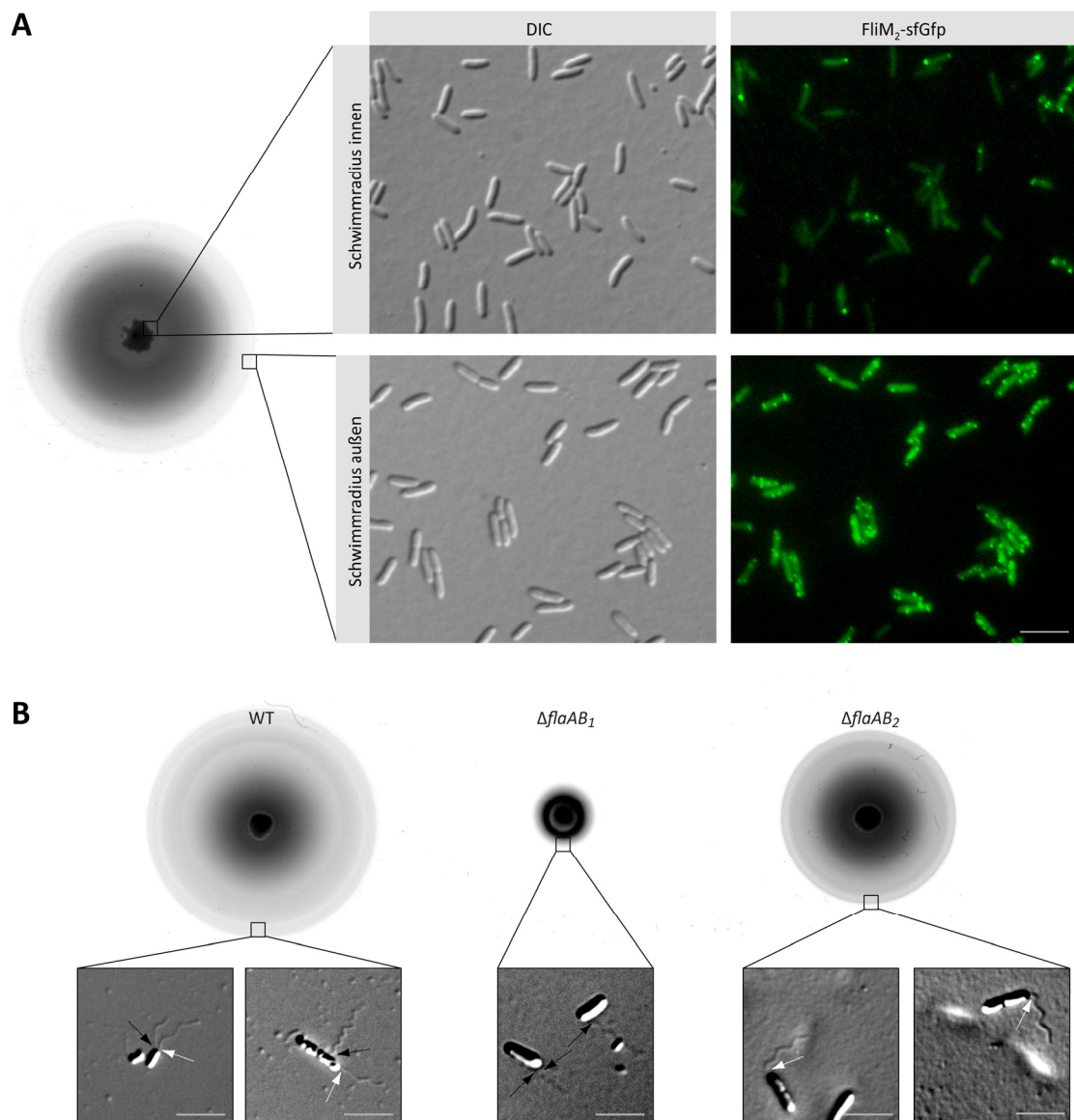


Abb. 19: Heterogenität in *S. putrefaciens* CN-32: Lokalisation von $\text{FliM}_2\text{-sfGfp}$ und Flagellierung.

A Der Stamm $\text{fliM}_2\text{-sfGfp}$ wurde 16 h in einer LB-Weichagarplatte mit 0,2 % Agar inkubiert (**links**). Jeweils 3 μl wurden direkt aus dem inneren oder dem äußeren Bereich des Schwimmradius entnommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (**rechts**). Zu sehen sind jeweils die DIC- und die Fluoreszenz-Aufnahmen. Etwa 50 % der Zellen aus dem inneren Bereich produzieren $\text{FliM}_2\text{-sfGfp}$, während im äußeren Bereich nahezu alle Zellen $\text{FliM}_2\text{-sfGfp}$ produzieren. **B** Vergleichender Motilitätsassay der Stämme ΔflaAB_1 (Deletion der polaren Flagelline) und ΔflaAB_2 (Deletion der lateralen Flagelline) mit dem Wildtyp (**oben**). Die Schwimmradien wurden nach einer Inkubationszeit von 16 h dokumentiert. Die Agarkonzentration lag bei 0,2 %. Anschließend wurden jeweils 3 μl aus dem äußeren Bereich der Schwimmradien entnommen und die Kulturen jeweils mit Flagellenfärbung behandelt. Die behandelten Zellen wurden jeweils lichtmikroskopisch mittels DIC untersucht (**unten**). Nahezu jede Zelle ist flagelliert, jedoch nie mit mehr als 1 oder 2 lateralen Flagellen im Fall des Wildtyps und des ΔflaAB_1 -Stammes. Der ΔflaAB_2 -Stamm weist ausschließlich polare Flagellen auf. Die weißen Pfeile markieren polare, die schwarzen Pfeile laterale Flagellen. Die Balken haben jeweils eine Abmessung von 5 μm .

produzierte nahezu jede Zelle am äußeren Rand des Schwimmradius FlIM₂-sfGfp, während im inneren Bereich nur etwa 50 % der Zellen FlIM₂-sfGfp produzierten, was mit der prozentualen Verteilung in planktonischer Kultur vergleichbar ist (s. Abb. 19A). In den Zellen aus der Peripherie konnten durchschnittlich drei fluoreszente Foci pro Zelle detektiert werden. Dies könnte bedeuten, dass diese Zellen möglicherweise auch durchschnittlich drei laterale Flagellen tragen, jedoch war aus vorherigen Versuchen bekannt, dass Zellen in planktonischer Kultur höchstens zwei laterale Flagellen pro Zelle produzieren. Zur genaueren Untersuchung der Flagellierung wurden nun die Flagellen der Zellen aus der Peripherie des Schwimmradius gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Analyse zeigte, dass diese Zellen ebenfalls höchstens zwei laterale Flagellen ausbilden und damit kein Unterschied bezüglich des Flagellierungsmusters besteht, wenn Zellen¹² in planktonischer Kultur oder in Weichagarplatten gewachsen sind (s. Abb. 19B). Der einzige, aber entscheidende Unterschied zu den planktonischen Zellen bestand darin, dass ein wesentlich größerer prozentualer Anteil der aus dem Randbereich des Schwimmradius isolierten Zellen laterale Flagellen besitzt. Diese Diskrepanz hängt vermutlich damit zusammen, dass eine größere Anzahl an Basalkörpern in den Zellen existieren, als Flagellenfilamente ausgebildet werden. In, im Zeitraffer aufgenommenen Zellen, die FlIM₂-sfGfp produzierten, konnte ich fluoreszente Foci beobachten, die sich innerhalb der Zellen bewegten (nicht gezeigt). Aufgrund dessen gehe ich davon aus, dass an den entsprechenden Basalkörpern kein Flagellenfilament adhäriert war, da sonst eine freie Bewegung nicht möglich wäre.

Die Präsenz und die Funktion, aber nicht die Anzahl der lateralen Flagellen, scheinen daher die entscheidenden Faktoren für ein effizientes Schwimmverhalten in *S. putrefaciens* CN-32 darzustellen. Möglicherweise bilden gerade die peripheren Zellen einer Population sowohl polare, als auch laterale Flagellen aus, weil diese besonders effektiv und sensitiv die Umgebung und das Nährstoffangebot wahrnehmen und sich daher zum Wohl der Gesamtpopulation gerichtet bewegen müssen. Aufgrund dieser Annahme lies sich die Hypothese aufstellen, dass das einzelne Chemotaxissystem in *S. putrefaciens* CN-32 eine Rolle in der effektiven Schwimmbewegung übernimmt und möglicherweise das laterale und das polare Flagellensystem koordiniert, wie es auch in *V. alginolyticus* beobachtet wurde [164]. Im Folgenden soll die Lokalisation der Komponenten des Chemotaxissystems beschrieben werden, sowie deren entscheidende Funktion für die Motilität von *S. putrefaciens* CN-32.

2.3.1 Das Chemotaxissystem von *S. putrefaciens* CN-32

Der essentielle Teil der, an der chemosensorischen Signaltransduktion beteiligten Proteine, wird von Genen codiert, die innerhalb des Flagellenclusters 1 liegen (vgl. Abb. 9, Tabelle 15). Darunter befinden sich Gene, die für die Histidinkinase CheA, zwei Kopplungsproteine CheW, die Methylesterase CheB, die Methyltransferase CheR, die CheY-spezifische Phosphatase CheZ, den

¹² Zu diesem Zweck wurden die Stämme *flaAB₁* und *flaAB₂* erstellt, da die Deletionen der Flagellin-codierenden Gene beider Flagellensysteme keinen Einfluss auf die Expression der Gene des jeweils anderen Flagellensystems haben (Stefanie Gasch, unveröffentlicht).

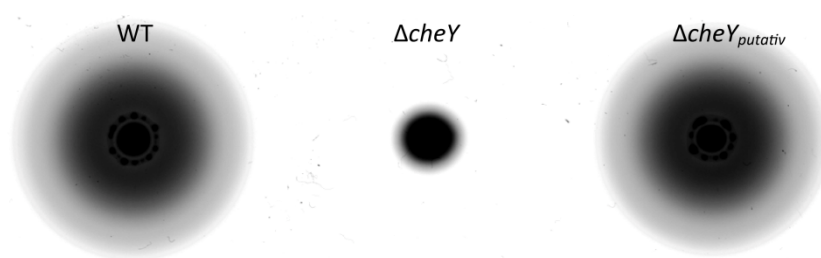


Abb. 20: Motilität von *S. putrefaciens* CN-32 in Abwesenheit von *cheY* und *cheY_{putativ}*

Schwimmphänotyp der *cheY* oder *cheY_{putativ}* Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp. 3 µl logarithmisch in planktonischer Kultur gewachsener Stämme mit ‚in frame‘ Deletionen der Gene *cheY* und *cheY_{putativ}* wurden auf Weichagarplatten (0,25 % Agar) aufgetropft und nach 16 h Inkubation auf den Schwimmphänotyp hin ausgewertet.

Antwortregulator CheY und einem CheW-Antwortregulator Fusionsprotein CheV codieren. Drei weitere *cheV*-Gene liegen im Genom verteilt (Sputcn32_2319, Sputcn32_2493 und Sputcn32_2798). Zusätzlich besitzt *S. putrefaciens* CN-32 ein breites sensorisches Repertoire von insgesamt 37 Methylakzeptierenden Chemotaxisproteinen (Quelle: <http://mistdb.com/>). Ein Gen, dessen Genprodukt Ähnlichkeit zu CheY aufweist, jedoch zwei, statt nur eine Antwortregulator-Domäne wie CheY beisteht (1. Domäne 60 %, 2. Domäne 50 % Ähnlichkeit zur CheY-Domäne), könnte ein potentiell, zweites Chemotaxis-Antwortregulatorprotein darstellen (*CheY_{putativ}*, Sputcn32_3324). Die Deletion von *cheY* im Wildtyp-Hintergrund zog einen schweren Schwimndefekt nach sich, während eine Deletion des *cheY_{putativ}* die Motilität unter den getesteten Bedingungen nicht beeinträchtigte (s. Abb. 20). Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass das polare, wie auch das laterale Flagellensystem von *S. putrefaciens* CN-32 durch ein einzelnes Chemotaxisssystem – und damit durch ein CheY Protein – gesteuert wird.

2.3.2 Lokalisation und Spezifität des Chemotaxisystems

Um Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation zu treffen und Indizien auf mögliche Interaktionen mit den Flagellensystemen zu sammeln, wurden Chemotaxisproteine in *S. putrefaciens* CN-32 mit Fluorophoren fusioniert und die entsprechenden Stämme fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zunächst wurde CheY aminoterminal – verbunden durch einen 3-fachen Glycin-Glycin-Serin-Linker – an sfGfp fusioniert und in einen Stamm eingebracht, in dem die Motorproteine FliM₁, bzw. FliM₂ mit mCherry fusioniert sind. Die Fluorophor-CheY Fusion hatte nur eine geringe Auswirkung auf die Motilität des Stammes (vgl. Abb. 39 im Appendix). Interessanterweise co-lokalisierte sfGfp-CheY mit FliM₁-mCherry am flagellierten Zellpol (s. Abb. 21), was dafür sprechen könnte, dass das gesamte Chemotaxisssystem am flagellierten Zellpol lokalisiert, ähnlich wie es auch für *Caulobacter crescentus* beobachtet wurde [95, 249]. Diese polare Lokalisation spricht demzufolge für eine Interaktion mit der polaren Flagelle, allerdings konnten auch laterale, oder subpolare Foci von sfGfp-CheY entdeckt werden, die in manchen Fällen auch mit fluoreszenten Foci von FliM₂-mCherry zu co-lokalisieren schienen (s. Abb. 21). Diese Beobachtungen deuten folglich auf eine mögliche Interaktion von CheY sowohl mit FliM₁, als auch mit FliM₂ hin. Zur genaueren Analyse wurden nun 19 der insgesamt 37 Methylakzeptierenden

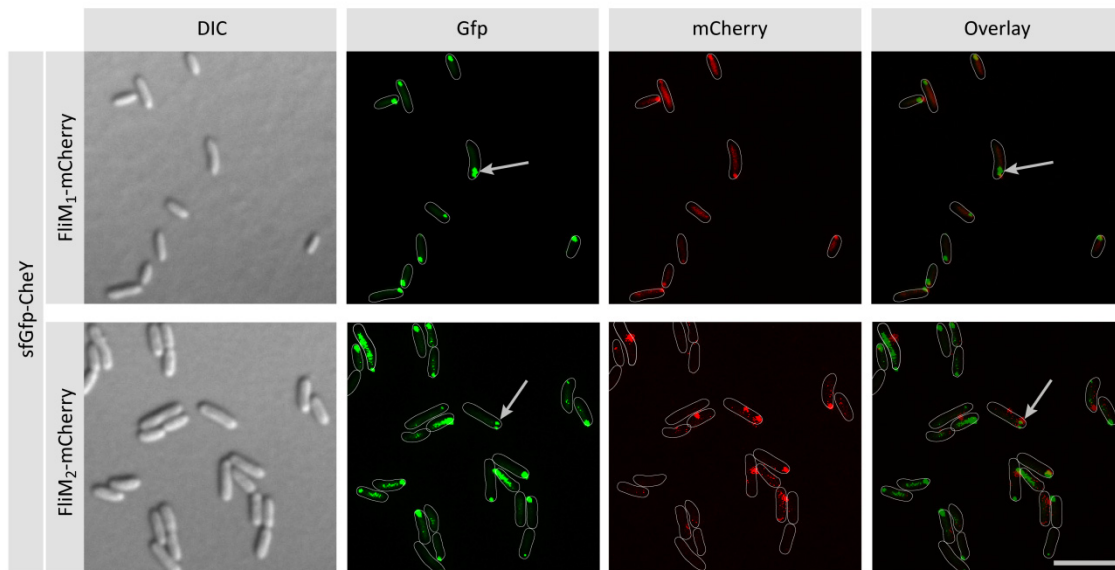


Abb. 21: Co-Lokalisation von CheY und FliM₁, bzw. FliM₂.

Links ist die lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) logarithmisch in LB gewachsener Zellen zu sehen, die entweder *sfGfp-cheY* mit *fliM₁-mCherry* oder *fliM₂-mCherry* co-exprimieren. Fluoreszente Foci von FliM₁-, bzw. FliM₂-mCherry sind in der Falschfarbe rot dargestellt, sfGfp-CheY ist in der Falschfarbe grün gehalten. Rechts sind jeweils die Überlagerungen des mCherry- und des Gfp-Fluoreszenzkanals zu sehen (Overlay). Die weißen Pfeile zeigen auf subpolar lokalisierende sfGfp-CheY Foci, die im Falle von FliM₂-mCherry potentiell co-lokalisieren. Der Balken hat die Abmessung von 5 µm.

Chemotaxisproteine¹³ in *S. putrefaciens* CN-32 mit sfGfp fusioniert und ihre Lokalisation mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass 17 der insgesamt 19 getesteten MCPs tatsächlich mit FliM₁-mCherry co-lokalisierten, während zwei unter den getesteten Bedingungen nicht produziert wurden. Allerdings konnten auch hier subpolar lokalisierende Foci – hier exemplarisch

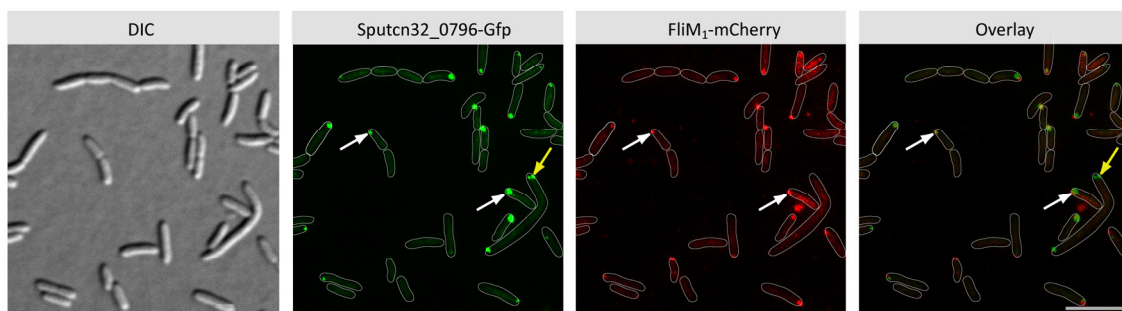


Abb. 22: Co-Lokalisation von einem MCP und FliM₁.

Links ist die lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) von logarithmisch in LB gewachsenen Zellen zu sehen, die neben genomisch integriertem *fliM₁-mCherry*, das MCP Sputcn32_0796 fusioniert mit *sfGfp* – am nativen Genom-Lokus integriert – exprimieren und produzieren. Fluoreszente Foci von Sputcn32_0796-Gfp sind in der Falschfarbe grün dargestellt, FliM₁-mCherry ist in der Falschfarbe rot markiert. Rechts ist die Überlagerung des Gfp- und des mCherry-Fluoreszenzkanals zu sehen (Overlay). Die weißen Pfeile zeigen auf mögliche Co-Lokalisation von Sputcn32_0796-Gfp und FliM₁-mCherry, gelbe Pfeile zeigen auf subpolar lokalisierende Foci von Sputcn32_0796-Gfp. Der Balken hat die Abmessung von 5 µm.

¹³ Im Rahmen des Masterpraktikums „Molecular and Cellular Microbiology – *Shewanella* motility“

für das MCP Sputcn32_0796 gezeigt (s. Abb. 22) – beobachtet werden, was somit dem Lokalisationsmuster von CheY ähnelt. Es besteht die Möglichkeit, dass an den Stellen an denen MCPs lokalisieren auch die restlichen Komponenten des Signaltransduktionskomplexes des Chemotaxisystems lokalisieren – demnach auch CheY. Diese Vermutung müsste jedoch erst über direkte Co-Lokalisationsstudien gezeigt werden. Allerdings kann eine funktionelle Interaktion von CheY mit dem Motor des lateralen Flagellensystems zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

Eine konstitutiv aktive und eine inaktive Version von CheY

Um die Rolle von CheY für die gerichtete Schwimmbewegung in *S. putrefaciens* CN-32 genauer zu untersuchen, wurden Substitutionsmutationen von CheY erstellt, die in *E. coli* entweder zu einer konstitutiv aktiven Version (GOF von engl.: *gain of function*), oder zu einer inaktiven Version (LOF von engl.: *loss of function*) von CheY führen [299, 306]. In der konstitutiv aktiven Form in *E. coli* sind zwei Aminosäuren substituiert: das Aspartat an der Position 13 zu einem Lysin und das Tyrosin an Position 106 zu einem Tryptophan. In der inaktiven Form ist das Aspartat an Stelle 57 zu einem Asparagin substituiert und stellt die unphosphorylierte Form von CheY dar [299, 306]. Die Primärstruktur des *E. coli* K-12 CheY ist mit einer Identität von 68 % und einer Ähnlichkeit von 84 % sehr ähnlich zu derjenigen des CheY in *S. putrefaciens* CN-32 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, vgl. Abb. 23C). Des Weiteren sind die Aminosäuren der aktiven Zentren von CheY auch in *S. putrefaciens* CN-32 konserviert und konnten somit jeweils ausgetauscht werden. Daraus ergaben sich die Stämme *cheY* GOF (*cheY^{D12K,Y105W}*) und *cheY* LOF (*cheY^{D56N}*). Während eine *cheY* LOF-Mutante das Schwimmverhalten einer Mutante ohne CheY ($\Delta cheY$) phänotypisierte und folglich noch eingeschränkt motil war, stellte sich der negative Effekt von *cheY* GOF auf die radiale Ausbreitung dieser Mutante noch drastischer dar, als in einer Deletionsmutante von *cheY* (s. Abb. 23B). Auf Einzelzellebene betrachtet wurde der Effekt von CheY auf die Richtungsänderung der Flagelle deutlich: so konnte für den *cheY* GOF-produzierenden Stamm, mit einer Zeitspanne von durchschnittlich 4 s zwischen Richtungsänderungen, ein drastisch erhöhter Wechsel der Schwimmrichtung im Vergleich zum Wildtyp (~20 s) und einer *cheY* LOF/ $\Delta cheY$ -Mutante (~174 s) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend schwimmen einzelne Zellen der *cheY* GOF Mutante in kurzen Abständen vorwärts und rückwärts, während eine *cheY* LOF-, bzw. eine $\Delta cheY$ -Mutante sehr lange in eine Richtung schwimmt, ohne die Drehrichtung der Flagelle zu ändern.

Zur intrazellulären Visualisierung der CheY GOF und LOF Version wurden die Proteine, ähnlich wie oben beschrieben, aminoterminal mit sfGfp fusioniert. Dies hatte keinen Einfluss auf die Motilität dieser Stämme (vgl. Abb. 39 im Appendix). sfGfp-CheY GOF lokalisierte, ähnlich wie die entsprechende Wildtyp-Version, vornehmlich am ‚alten‘ Zellpol, jedoch mit gelegentlich subpolar oder lateral auftretenden zusätzlichen Foci (s. Abb. 23A). Die inaktive Form sfGfp-CheY LOF lokalisierte ebenfalls ähnlich wie sfGfp-CheY, jedoch traten häufiger laterale Foci auf, als in der Wildtyp-Version oder der konstitutiv aktiven Version von CheY. Immunologische Verfahren zur Überprüfung der Stabilität der Fusionsproteine wurden noch nicht durchgeführt.

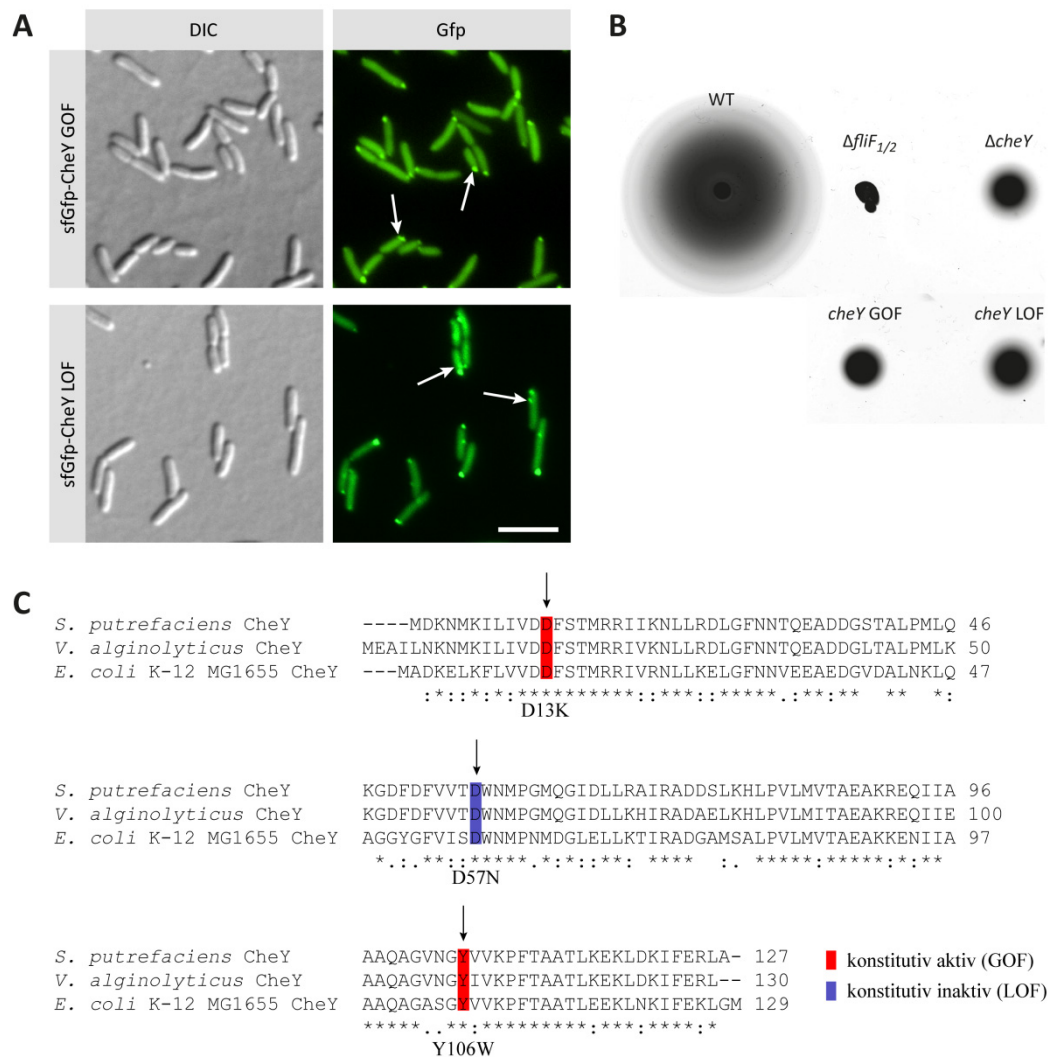


Abb. 23: Lokalisation und Funktion eines konstitutiv aktiven (GOF) und eines inaktiven (LOF) CheY.

A Zellen, die entweder sfGfp-CheY GOF oder sfGfp-CheY LOF produzieren, wurden planktonisch in LB kultiviert und zum Zeitpunkt der logarithmischen Wachstumsphase fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Fluoreszente Foci von sfGfp-CheY GOF oder LOF sind in der Falschfarbe grün dargestellt. Die Pfeile deuten auf subpolare oder laterale Lokalisation von sfGfp-CheY GOF/LOF. Der Balken hat die Abmessung von 5 μ m. **B** Vergleichende Analyse des Schwimmphänotyps der *cheY* GOF- und LOF-Mutante. Während die *cheY* LOF-Mutante der *cheY*-Deletionsmutante gleicht, hat die Insertion von *cheY* GOF eine noch stärkere Einschränkung der radialen Ausbreitung zu Folge. Stämme mit entsprechenden ‚in frame‘ Insertionen von *cheY* GOF oder LOF wurden auf Weichagarplatten (0,25 % Agar) aufgetropft und nach 16 h Inkubation ausgewertet. **C** Bioinformatischer Abgleich der Sequenzen dreier CheY Homologe von *S. putrefaciens* CN-32, *V. alginolyticus* und *E. coli* K-12 MG1655. CheY_{*S. putrefaciens*} ist zu CheY_{*V. alginolyticus*} 91 % und zu CheY_{*E. coli*} 68 % sequenzidentisch (ClustalW2 <http://www.ebi.ac.uk/>, BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Pfeile markieren spezifische, für die Funktion wichtige Aminosäurereste. Rot markiert sind die Reste Aspartat 13 und Tyrosin 106, deren Mutationen zu Lysin (D13K), bzw. Tryptophan (Y106W) in *E. coli* zu einer konstitutiv aktiven Form von CheY führen [306]. Lila gekennzeichnet ist das konservierte Aspartat 57, welches von CheA phosphoryliert wird. Die Substitution dieser Aminosäure zu Asparagin verhindert in *E. coli* die Phosphorylierung und zieht die Inaktivität des Proteins nach sich [299].

Die Spezifität des Chemotaxisystems

Funktionale Analysen und die Lokalisation von CheY können jedoch nur begrenzt etwas über die Spezifität des Chemotaxisystems aussagen. Um die Spezifität des Chemotaxisystems bezüglich der Flagellensysteme zu determinieren, wurde zunächst eine *cheY*-Deletion in den Hintergrund einer Mutante eingeführt, in der bereits die Flagelline des polaren Flagellensystems

deletiert wurden ($\Delta flaAB_1 \Delta cheY$). Dieser Stamm kann kein polares Filament ausbilden, besitzt aber noch das laterale Flagellensystem, um sich fortzubewegen (s. Abb. 24). Schwimmuntersuchungen zeigten, dass dieser Stamm interessanterweise keinen additiven Schwimmphänotyp, verglichen mit den jeweiligen Einzel-Deletionsmutanten aufweist. Die Zellen konnten in Weichagar noch ebenso gut schwimmen wie eine $\Delta flaAB_1$ -Mutante. Im Gegensatz dazu war ein Stamm, der weder laterale Filamente ausbilden kann, noch *cheY* besitzt ($\Delta flaAB_2 \Delta cheY$), auf einer Weichagarplatte nicht motil (s. Abb. 24). Wichtig ist es hier allerdings anzumerken, dass dieser Stamm auf Einzelzellebene in planktonischer Kultur das gleiche Schwimmverhalten zeigt wie eine $\Delta cheY$ -, bzw. eine *cheY* LOF-Mutante (s. oben). Das bedeutet also, dass trotz der Fähigkeit geradeaus zu schwimmen, die Motilität durch die netzartige Struktur des Weichagars nicht mehr gewährleistet ist, wenn das sekundäre Flagellensystem und CheY fehlen. Würde das Chemotaxissystem mit dem lateralen Flagellensystem interagieren, müsste zumindest der Stamm $\Delta flaAB_1 cheY$ GOF einen unterschiedlichen Phänotyp zu einem $\Delta flaAB_1 \Delta cheY$ -Stamm zeigen, vorausgesetzt, die Wirkungsweise und Interaktion von CheY wäre bei beiden Flagellensystemen identisch. Allerdings zeigte sich, dass weder die Insertion einer inaktiven, noch die einer konstitutiv aktiven Version von CheY in einen Stamm, welcher lediglich ein funktionales laterales Flagellensystem besaß ($\Delta flaAB_1 cheY$ LOF, bzw. GOF) einen Einfluss auf die Funktionalität der lateralen Flagellen hatte. Jedoch müssten funktionelle Interaktionsstudien von CheY mit den Motorkomplexen der Flagellensysteme durchgeführt werden, um zu untermauern, dass CheY ausschließlich mit dem polaren Flagellensystem interagiert. Die bisher durchgeführten Versuche weisen also darauf hin, dass das Chemotaxissystem in *S. putrefaciens* CN-32 spezifisch mit dem polaren Flagellensystem interagiert

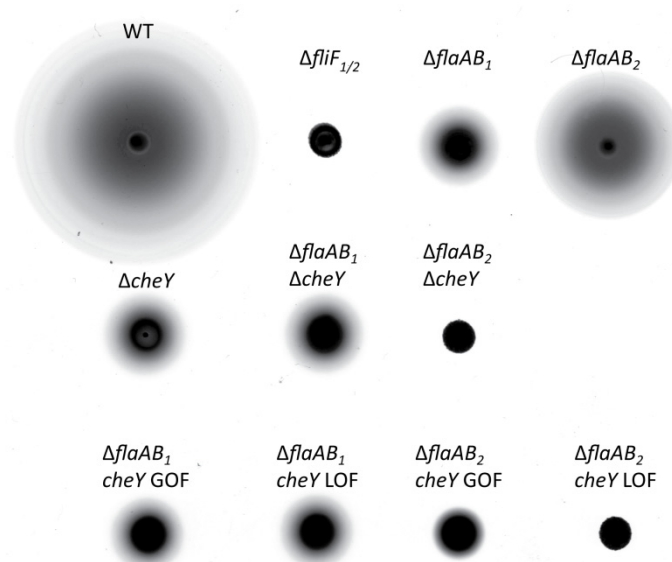


Abb. 24: Die Spezifität von CheY.

Schwimmphänotypen der Mutanten, die entweder Defekte im polaren, bzw. lateralen Flagellensystem aufweisen, im Vergleich zu Chemotaxismutanten im Hintergrund der Mutanten des polaren, oder lateralen Flagellensystems. Jeweils 3 μ l logarithmisch in planktonischer Kultur gewachsener Stämme mit entsprechenden ‚in frame‘ Deletionen von *cheY* oder Insertionen von *cheY* GOF/LOF wurden auf Weichagarplatten (0,25 % Agar) aufgetropft und nach 16 h Inkubation ausgewertet.

und dessen Funktion moduliert. Wie zu erwarten, erzielte daher eine Insertion von *cheY* LOF in einer Δ *flaAB*₂-Mutante, welche nur noch eine funktionale polare Flagelle besitzt, den gleichen nicht-motilen Schwimmphänotyp in Schwimmplatten, wie eine Deletion von CheY im selben genotypischen Hintergrund (s. Abb. 24). Erstaunlicherweise konnte eine konstitutiv aktive Form von CheY diesen nicht-motilen Phänotyp zu einem gewissen Teil komplementieren (Δ *flaAB*₂ *cheY* GOF). In dieser Mutante kann also die schnelle Richtungsänderung der Flagellendrehung den Verlust der lateralen Flagelle minimal, aber deutlich, kompensieren.

Es lässt sich folglich festhalten, dass das Chemotaxissystem in *S. putrefaciens* CN-32 vermutlich spezifisch mit der polaren Flagelle interagiert. Des Weiteren zeigte sich, dass in einer Mutante, die ausschließlich eine polare Flagelle besitzt, ein Unterschied besteht zwischen einer polaren Flagelle, die schnell die Drehrichtung ändert, und einer polaren Flagelle, welche die Drehrichtung extrem selten ändert. Während eine inaktive Version von CheY in einem Stamm mit lediglich einer polaren Flagelle zu einem komplett nicht-motilen Phänotyp in Weichagarplatten führte, konnte ein Stamm mit einer konstitutiv aktiven Version von CheY und einer polaren Flagelle wieder (sehr eingeschränkt) schwimmen, und zwar exakt so, wie ein Stamm, in dem neben der polaren Flagelle auch das laterale Flagellensystem noch existiert (*cheY* GOF) (vgl. Abb. 23B). Dazu konträr zeigte ein *cheY* LOF-Stamm (es existiert sowohl das polare, wie auch das laterale Flagellensystem in diesem Stamm) einen Phänotyp, der einem Phänotyp nach Deletion des polaren Flagellensystems oder nach Deletion von CheY entspricht (vgl. Abb. 23B und Abb. 24). Wenn in diesem Stamm jedoch zusätzlich die Funktionalität der lateralen Flagelle zerstört ist, gab es keinerlei radiale Ausbreitung auf Weichagarplatten, auch wenn die Zellen in planktonischer Kultur beweglich waren (vgl. Abb. 24). Die Frage ist also, welche Rolle die laterale Flagelle und vor allem das Zusammenspiel der lateralen Flagelle mit der polaren Flagelle in der erfolgreichen Exploration neuer Habitate spielt. Eine Hypothese ist daher, dass zwar das Chemotaxissystem nicht mit dem lateralen Flagellensystem interagiert, jedoch die lateralen Flagellen als eine Art Steuerruder fungieren könnten, um den Zellen somit effektives Schwimmverhalten zu ermöglichen. Daher sollte als nächster Schritt, die Eigenschaft der Rotation der lateralen Flagellen untersucht werden, um deren Funktion in einem dualen Flagellensystem erklären zu können.

Mikroskopische Untersuchungen von Zellen, die nur funktionale laterale Flagellen ausbilden (Δ *flaAB*₁) ergaben, dass laterale Flagellen – unabhängig von der Präsenz von CheY, CheY GOF oder CheY LOF – ausschließlich CCW rotieren (Daten nicht gezeigt). Dies wurde über sogenannte ‚*tethered cells*‘ (Zellen, die mit der Flagelle an einer Oberfläche anhaften und nur den Zellkörper drehen) bestimmt. Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die bidirektionalen polaren Flagellen bei CCW-Rotation mit den CCW-rotierenden lateralen Flagellen ein Bündel bilden könnten. Dies würde nur dann erfolgen, wenn die Zelle vorwärts schwimmt, da nur dann die polare Flagelle ebenfalls CCW rotiert.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die bislang durchgeführten Ergebnisse darauf hinweisen, dass in *S. putrefaciens* CN-32, neben dem spezifischen dualen Flagellensystem, auch ein – für die polare Flagelle spezifisches – Chemotaxissystem existiert. Für die Fortbewegung durch Schwimagar ist folglich das Zusammenspiel einer, durch das Chemotaxissystem gesteuerten, bidirektionalen polaren Flagelle neben dem unidirektionalen lateralen Flagellensystem notwendig.

2.3.3 Der Einfluss von Heterogenität auf effektives Schwimmverhalten

Zwei distinkte, synchron funktionierende Flagellensysteme und ein spezifisch mit der polaren Flagelle interagierendes Chemotaxissystem sind essentiell für ein effektives und gerichtetes Schwimmverhalten. Um die Analyse der effektiven Schwimmbewegung direkter durchführen zu können, etablierte ich einen Konkurrenzversuch, in dem die Stämme $\Delta flaAB_1$ oder $\Delta flaAB_2$ gegen den Wildtyp „antraten“. Zu diesem Zweck wurden chromosomale Insertionen von *yfGfp* oder *mCherry* in das jeweilige Genom, der zu testenden Stämme durchgeführt, die durch den konstitutiv aktiven *motAB*-Promotor (MotP) von *S. oneidensis* MR-1, kontinuierlich transkribiert wurden. Dazu wurde die Genregion stromabwärts des konservierten *glmS*-Gens als Rekombinationsstelle gewählt, der auch dem Tn7-Transposon als Insertionsort dient. Die Lebendfluoreszenzmarkierung verschiedener Stämme ermöglicht es, diese in Co-Kultur zu beobachten und quantitative Aussagen über die Leistungsfähigkeit der Flagellensysteme zu machen. Die Fluoreszenzmarkierung hatte keinen Effekt auf die Motilität der einzelnen Stämme (vgl. Abb. 40 im Appendix).

Zunächst wurde dieser Assay in Weichagarplatten durchgeführt und dabei die Zusammensetzung einer im 1:1-Verhältnis antretender Population aus Wildtyp-Zellen im Vergleich zu der $\Delta flaAB_1$ - oder $\Delta flaAB_2$ -Mutante analysiert. Dafür wurden die Populationen auf Weichagarplatten aufgetropft und nach der Inkubationszeit, an der Innenseite, an der Außenseite und an einer mittleren Position des Radius Proben genommen, die nachfolgend fluoreszenzmikroskopisch untersucht und ausgewertet wurden. Die prozentuale Populationszusammensetzung konnte somit einfach über die Fluoreszenz der Einzelzellen bestimmt werden. Während im Zentrum des Schwimmradius der prozentuale Anteil des Wildtyps verglichen mit der jeweiligen Mutante etwa gleich war, änderte sich dies, je weiter zum äußeren Rand hin die Proben genommen wurden. Erstaunlich war allerdings, dass sowohl Mutanten, denen entweder die polaren, oder die lateralen Filamente fehlten, prozentual im äußeren Ring vertreten waren, zum Teil mit bis zu 20 % im Fall von $\Delta flaAB_2$. Selbst eine $\Delta flaAB_1$ -Mutante konnte mit bis zu 10 % der Gesamtpopulation am äußeren Rand des Schwimmradius vertreten sein. Jedoch machte der Wildtyp stets den größeren Teil der Population am äußeren Rand des Schwimmradius aus. Daraus ergab sich das Bild, dass der Wildtyp sich, in Bezug auf die Effektivität des Schwimmverhaltens, immer gegenüber einer polaren oder lateralen Flagellen-Mutante durchsetzt (s. Abb. 25).

Dieses Ergebnis bestätigt, dass in einer Population von Zellen sich diejenigen am besten in Weichagarplatten fortbewegen können, welche die Möglichkeit haben, beide Flagellensysteme einzusetzen. Weichagarplatten sind in ihrer Beschaffenheit weder viskos, noch fest, sondern ähneln eher flüssigem Medium, das von einer großen Zahl Agarosepolymeren durchzogen ist und somit eine halbfeste Struktur bildet. Zellen, die in Weichagarplatten schwimmen, müssen somit durch ein Netzwerk von Poren navigieren, um sich effektiv fortbewegen zu können. Die Notwendigkeit einer robusten Navigation ist unter diesen Umständen nicht von der Hand zu weisen. Jedoch stellt sich die Frage, ob die speziellen Bedingungen des Weichagars die Subpopulation der Zellen begünstigt, welche beide Flagellensysteme produziert – was demnach einen sekundären Effekt darstellen würde – oder ob es vielmehr so ist, dass ein duales Flagellensystem für *S. putrefaciens* CN-32 generell einen Vorteil für die Motilität bedeutet, auch wenn die Bewegungsgeschwindigkeit der einzelnen Zellen

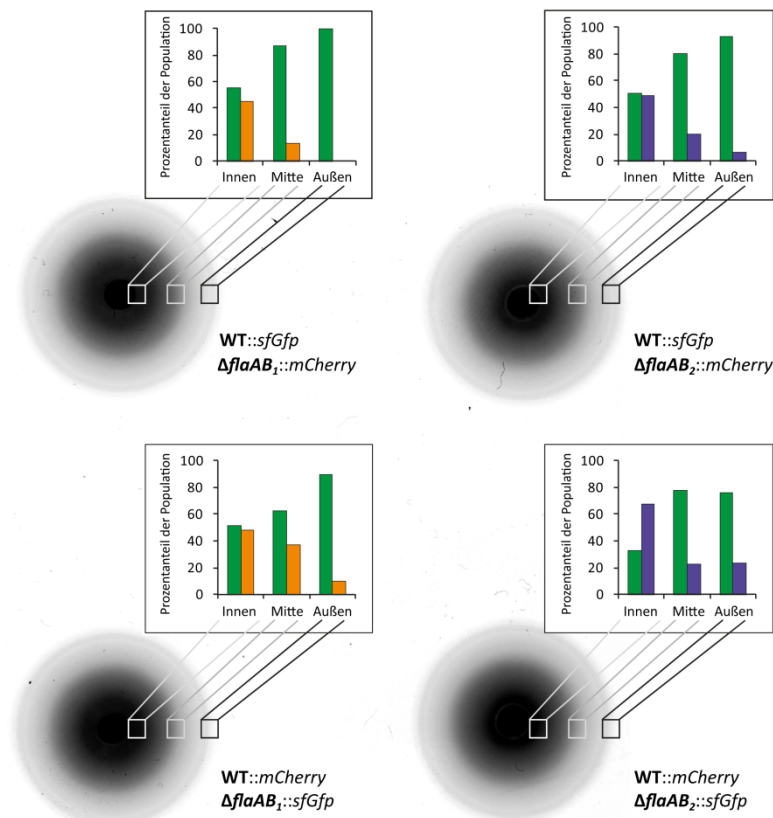


Abb. 25: Konkurrenzversuch der Populationen in Weichagar.

Gezeigt ist ein Assay von fluoreszenzmarkierten Wildtyp-, $\Delta flaAB_1$ - und $\Delta flaAB_2$ -Kulturen, welche im 1:1-Verhältnis gemischt und jeweils 3 μ l der Co-Kultur auf eine Weichagarplatte getropft wurden (0,2 % Agar). Sowohl die Wildtyp-Zellen, als auch die Zellen der Mutanten produzierten konstant sfGfp oder mCherry. Nach 16-stündiger Inkubation wurde die radiale Ausbreitung dokumentiert. Die Auswertung der Proben, die aus dem inneren (Innen), mittleren (Mitte), oder äußeren (Außen) Bereich der Radien genommen wurden und die anschließende Untersuchung mittels Epifluoreszenzmikroskopie im grünen, wie im roten Emissionsbereich zeigten die jeweilige Populationszusammensetzung des Wildtyps (grün) im Vergleich zu einer $\Delta flaAB_1$ - (orange) oder einer $\Delta flaAB_2$ -Mutante (lila), dargestellt als Balkendiagramm mit Angaben der Werte (gezählte Zellen innerhalb der Gesamtpopulation; mindestens 400 Zellen pro Population) in Prozent. Die Tendenz der Ergebnisse war unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung der Stämme.

an sich keine Rolle spielt. Das würde bedeuten, dass in *S. putrefaciens* CN-32 Subpopulationen gezielt aus dem Grund existieren, um auf Kosten eigener Energieressourcen zum Wohle der Gesamtpopulation besonders effektiv zu neuen Nährstoffen navigieren zu können. Wie jedoch prägt sich diese Navigation aus und besteht ein Effekt dieser Navigation auch in flüssigem Medium, ohne Netzwerk von Poren – nicht zuletzt unter dem Gesichtspunkt der beobachteten Expression beider Flagellensysteme in flüssigem Medium? Um dies zu untersuchen, entwarf ich einen Populationsassay in Flüssigmedium mittels sogenannter Chemotaxis-Kammern, deren Charakteristikum das Vorhandensein zweier Medium-Reservoirs darstellt, die durch einen dünnen Kanal verbunden sind. Der Kanal und die Medium-Reservoirs wurden mit LB befüllt, welches mit Chloramphenicol versetzt war, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch Zellwachstum zu vermeiden. In einer Medium-Reservoirkammer wurde nun eine Population im 1:1-Verhältnis Wildtyp zu $\Delta flaAB_1$, bzw. $\Delta flaAB_2$ inkubiert, die jeweils zuvor mit entsprechenden Fluorophoren markiert wurden (wie zuvor beschrieben). Diese Population bewegte sich nachfolgend durch das Medium-Reservoir und den dünnen Kanal auf das zweite Reservoir zu. Dort wurden nach

entsprechender Inkubationszeit Proben genommen und die Populationszusammensetzung über Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Als Kontrolle diente hierbei die Population bestehend aus *sfGfp* und *mCherry* exprimierenden Wildtyp-Stämmen. Wie zu erwarten, zeigte die anschließende Populationsuntersuchung des Kontrollversuchs, dass beide Wildtypstämme zu gleichen Teilen die Population im Ziel-Reservoir bildeten (s. Abb. 26). Im Gegensatz dazu erreichte jedoch der Wildtyp stets effektiver das gegenüberliegende Reservoir als eine Mutante deren polares ($\Delta flaAB_1$) oder laterales ($\Delta flaAB_2$) Flagellensystem defekt war. Der Defekt des polaren Flagellensystems resultierte dabei wie zu erwarten in einen drastischeren Unterschied, als der Defekt des sekundären Flagellensystems. Während eine $\Delta flaAB_1$ -Mutante nur bis zu 30 % der Population des Ziel-Reservoirs ausmachte, waren es bei der $\Delta flaAB_2$ -Mutante bis zu 40 % der Gesamtpopulation. Dieses Ergebnis belegt, dass die auftretende Subpopulation in *S. putrefaciens* CN-32, die neben der

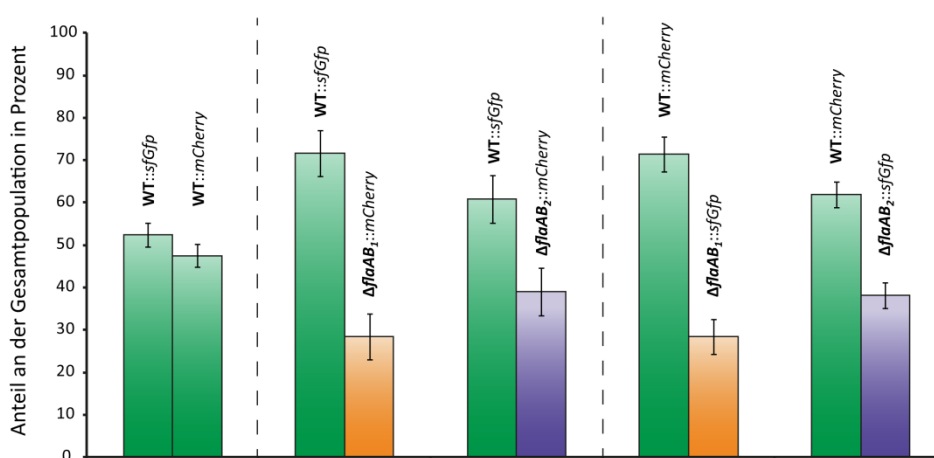


Abb. 26: Konkurrenz-Assay der Populationen in planktonischer Kultur.

Wildtyp- und entsprechende Deletions-Stämme, die jeweils *sfGfp* oder *mCherry* produzierten, wurden wie in Abb. 25 erklärt gemischt und anschließend in einem Mediumreservoir einer Chemotaxis-Kammer inkubiert. Anschließend wurden Proben aus dem zweiten Mediumreservoir entnommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Verteilung der Stämme im Ziel-Reservoir nach einer Inkubation von 12 h. Die Populationsverteilung wurde entsprechend der Erklärung in Abb. 25 determiniert. Weder *sfGfp*, noch *mCherry* beeinträchtigten das Schwimmverhalten des Wildtyps (grün) und bildeten daher in Co-Kultur zu gleichen Teilen die Population im Ziel-Reservoir. In Co-Kultur mit einer $\Delta flaAB_1$ - (orange), oder $\Delta flaAB_2$ -Mutante (lila), bildete der Wildtyp stets den größeren Teil der Population im Ziel-Reservoir.

polaren Flagelle, auch ein oder zwei zusätzliche subpolare oder laterale Flagellen produziert, effektiver navigieren kann, als Zellen, die jeweils nur eines von beiden Flagellensystemen produzieren können. Damit stellt das duale Flagellensystem in *S. putrefaciens* CN-32 ein fundamental neues Konzept zur effektiven Navigation bei Bakterien dar.

2.4 Eigenschaften und Charakteristika des Flagellenfilaments in *S. oneidensis* MR-1

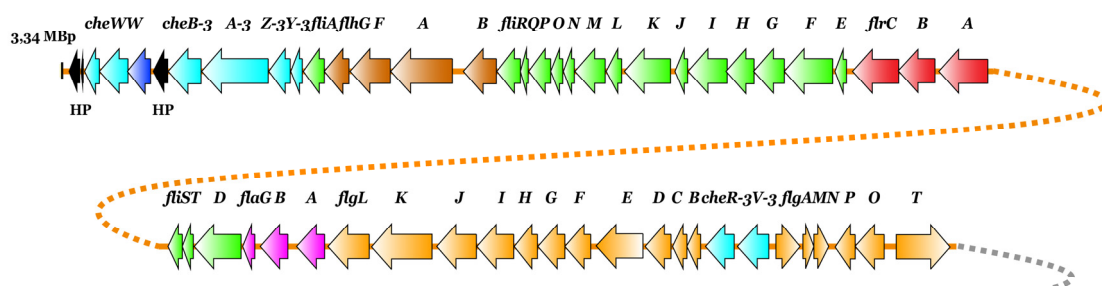
Von dem dualen Flagellensystem in *S. putrefaciens* CN-32 will ich mich nun dem polaren Flagellensystem von *S. oneidensis* MR-1 und im speziellen dem Flagellenfilament und dessen posttranslationale Modifizierung zuwenden. Anders als *S. putrefaciens* CN-32, besitzt *S. oneidensis* MR-1 nur ein polares Flagellensystem, was jedoch durch ein Hybrid-Statorsystem eines dualen Statorsystems betrieben werden kann. Nach einer Transposon-Mutagenese, mit dem Ziel Biofilm-defiziente Stämme zu finden, wurde ein Gencluster entdeckt, dessen Gene für Proteine codieren könnten, die in die Modifizierung des Flagellenfilaments involviert sind. Eine immer größer werdende Zahl an Organismen scheint Flagelline posttranslational zu modifizieren, daher war es interessant, die Eigenschaften der Flagellenmodifizierung von diesem nicht-pathogenen Organismus und die Charakteristika der Flagellenmodifizierungsregion zu untersuchen. Das Flagellenfilament besteht vermutlich aus zwei Flagellin-Untereinheiten, FlaA (SO_3238) und FlaB (SO_3237), wobei FlaB das Hauptflagellin darstellt [398]. Beide Flagelline weisen untereinander einen hohen Grad an Ähnlichkeit auf – sie sind zu 89 % sequenzidentisch – jedoch weist nur die Promotorregion von *flaB* die Konsensussequenz (TAAAG-N₁₄-GCCGTTAA) des Sigma-Faktors σ^{28} auf [330].

Tabelle 5: Gene der Modifizierungsregion von *S. oneidensis* MR-1. Vorläufige Gen-Nomenklaturen sind in runde Klammern gesetzt.

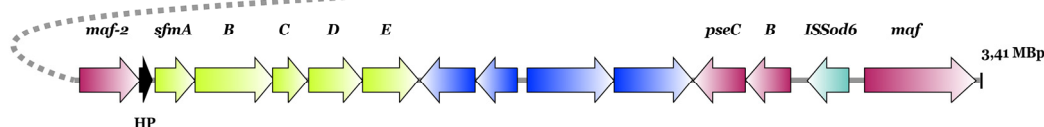
Gen-Nomenklatur	Lokus-Tag	annotierte Funktion des Proteins	annotierte Domänen
(maf-2)	SO_3259	hypothetisches Protein	MAF_flag10/DUF115
	SO_3260	hypothetisches Protein	
sfmA	SO_3261	N-Acetylneuraminsäure-Synthase-Domänen-Protein (NeuB)	NeuB: N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) Synthase
sfmB	SO_3262	Acetolaktat Synthase Isoenzym I, große Untereinheit (IlvB)	TPP-N/M/C: Thiaminpyrophosphat Bindedomäne
sfmC	SO_3263	3-Oxoacyl-Reduktase (Acyl-Transport-Protein)	adh_short: Kurzketten Dehydrogenase/Reduktase Domäne
sfmD	SO_3264	S-Adenosylmethionin-abhängige (SAM) Methyltransferase	Methyltransf_12: SAM-abhängige Methyltransferase
sfmE	SO_3265	hypothetisches Protein	ATP-grasp_4: ATP-abhängige Carboxylat-Amin Ligase
	SO_3266	hypothetisches Protein	Methyltransf_31: Methyltransferasedomäne
	SO_3267	hypothetisches Protein	Methyltransf_23: Methyltransferasedomäne
	SO_3268	Alpha-Amylase-Domänenprotein	Glyco_hydro_57: Glycosylhydrolase Familie 57 Domäne (hydrolysiert glycosidische Bindungen)
pseC	SO_3269	Cytidyltransferase-ähnliches Protein	CTP_transf_3: Acylneuraminat Cytidyltransferasedomäne
	SO_3270	Polysaccharidbiosynthese-Protein	DegT_DnrJ_EryC: DegT/DnrJ/EryC1/StrS Aminotransferase Familie
	SO_3271	Polysaccharidbiosynthese-Protein	Polysacc_synt_2: Polysaccharidbiosynthese Proteindomäne
ISSod6	SO_3272	Transposon	
(maf)	SO_3273	hypothetisches Protein	MAF_flag10/DUF115

Viele Studien der letzten Jahre zeigten, dass die Modifizierung von Flagellinen in Bakterien eine wichtige Rolle für die Assemblierung der Flagelle spielt [98, 200, 284, 388]. In Bakterien werden dabei ausschließlich Serine oder Threonine O-glykosidisch modifiziert. Stromabwärts der Genregion für das Flagellensystem von *S. oneidensis* MR-1 befindet sich innerhalb einer mindestens 14 Gene umfassenden Region (s. Abb. 27 und Tabelle 5) das oben erwähnte Operon – bestehend aus fünf Genen (SO_3261 – SO_3265). Gene dieses Operons wurden in einer Tn5-basierten Transposon-Mutagenese als Biofilm-relevante Gene identifiziert. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass diese Gene eine essentielle Rolle für die Motilität von *S. oneidensis* MR-1 spielen, wodurch sich der Biofilmdefekt erklärte. Das monocistronische Gencluster (Diplomarbeit Kim Dohlich, unveröffentlicht) steht ebenfalls unter der Kontrolle von σ^{28} [330]. Die Untersuchung der annotierten Funktion und Domänen der putativen Genprodukte dieser Gene ergab, dass es sich vermutlich um eine Genregion handelt, welche in die Modifizierung der Flagelline involviert sein könnte. So handelt es sich bei SO_3261 vermutlich um ein N-Acetylneuraminsäure-Synthase-Domänen-Protein (NeuB), welches N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) oder Pseudaminsäure (Pse)

A Flagellengenregion



B Modifizierungsregion



C abseits liegende Statorgene



Abb. 27: Genregionen des polaren Flagellensystems und der Flagellinmodifizierung in *S. oneidensis* MR-1.

A Genregion des polaren Flagellensystems von *S. oneidensis* MR-1. **B** Direkt anschließende Genregion, die vermutlich Gene des Modifizierungssystems der Flagelline enthält. **C** Nicht mit den Clustern verbundene, abseits liegende Statorgene des polaren Flagellensystems. Farbcodierung: *fli*-Gene sind grün, *flg*-Gene hellbraun, *flh*-Gene dunkelbraun und *fla*-Gene pink markiert. Die Hauptregulatoren (*flr*) sind rot markiert. Dem Chemotaxisystem zugehörige Gene sind hellblau markiert, die für Statoren codierenden Gene in grau. Das für die Flagellinmodifizierung codierende Operon SO_3261 – SO_3265 wurde neu annotiert (*sfmABCDE* für *Shewanella* Flagellin Modifizierung) und ist hellgrün markiert. Dunkelrot sind *pse*-Gene und *maf*-Gene (engl.: *motility accessory factor*), die ihrerseits Ähnlichkeit zu *pse*-Genen aufweisen. Dunkelblau markiert sind Gene für deren Genprodukte eine Funktion annotiert ist, jedoch kein Name existiert. Schwarz gekennzeichnet sind Gene, die für hypothetische Proteine (HP) codieren. Die Zahlen geben die Lage im Genom von *S. oneidensis* MR-1 wieder.

synthetisieren kann. Das Genprodukt von SO_3262 enthält eine N-terminale, mittlere und C-terminale Thiaminpyrophosphat-Bindedomäne, und ist als die Haupt-Untereinheit der Acetolaktat-Synthase-Isoenzym I (IlvB) annotiert. Das Protein, für welches das Gen SO_3263 codiert, ist als 3-Oxoacyl-Reduktase (Acyl-Transport-Protein) annotiert und besitzt eine Dehydrogenase/Reduktase-Domäne. Das vierte Gen des Operons, SO_3264, codiert für ein Protein, welches eine putative S-Adenosylmethionin-abhängige (SAM) Methyltransferase darstellen könnte. SO_3265 – das letzte Gen des Operons – ist als ein für ein hypothetisches Protein codierendes Gen annotiert, jedoch besitzt dieses Protein die Domäne einer ATP-abhängigen Carboxylat-Amin Ligase. Im Lauf ihrer Diplomarbeit erstellte Kim Dohlich *in frame*-Deletionsmutanten aller fünf Gene des Operons und konnte erste Hinweise auf die Modifikation des Flagellins von *S. oneidensis* MR-1 sammeln. Durch massenspektrometrische (MS) Untersuchungen mittels initialer LC-MS (engl.: *liquid chromatography mass spectrometry*) und nachfolgender MALDI-TOF MS (engl.: *matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight*) des aufgereinigten Flagellins konnte eine Modifizierung mit der Größe 500 – 580 Da detektiert werden [71]. Außerdem wiesen bei elektronenmikroskopischer Untersuchung alle Deletionsmutanten der Gene des Operons eine Veränderung in der Beschaffenheit der produzierten Filamente auf, die sich dergestalt ausprägte, dass die Flagellenfilamente der Mutanten ΔSO_3261 – ΔSO_3264 extrem verkürzt waren [71]. Entsprechend hatten mindestens zwei der fünf Deletionen einen schweren Schwimmpheotyp zur Folge [71]. Aufgrund der putativen Rolle des Operons für eine Modifizierung der Flagelline in *S. oneidensis* MR-1, soll an dieser Stelle die fortan gültige Nomenklatur dieses Operons eingeführt werden: *sfmABCDE* (für *S*hewanella *F*lagellin *M*odifizierung). Um nun genauere Analysen der Flagelline FlaA und FlaB von *S. oneidensis* MR-1 durchführen zu können, sollten zunächst Antikörper gegen die Flagelline erstellt werden, um immunbiologische Ansätze zu ermöglichen.

2.4.1 Die Flagelline FlaA und FlaB von *S. oneidensis* MR-1

Zwei Flagelline, die beide unterschiedlich reguliert zu sein scheinen [398], existieren in *S. oneidensis* MR-1. In vielen Organismen werden die Flagellenfilamente aus einem einzigen Flagellin als Grundbaustein aufgebaut, so zum Beispiel in *S. enterica*, oder *E. coli*. Andere Organismen besitzen eine Vielzahl an Genen, die für Flagelline codieren und komplexe Flagellenfilamente assemblieren können. Beide Flagelline FlaA und FlaB in *S. oneidensis* MR-1 weisen auf der Ebene der Proteinsequenz mit 89 % einen hohen Grad an Sequenzidentität auf. Beide Flagelline haben eine kalkulierte molekulare Masse von etwa 28 kDa, weisen jedoch bei Untersuchung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ein anderes Laufverhalten auf, als die vorhergesagte Masse der Proteinsequenz vermuten lässt, was mit einer Größe von etwa 36 kDa korrespondiert. Angenommen, die putative Modifikation der Flagelline ist für das veränderte Laufverhalten der Flagelline verantwortlich, könnte eine immunologische Detektion der Flagelline, die von einzelnen Mutanten des *sfmABCDE* Operons produziert werden, die damit einhergehende Massenveränderung visualisieren. Ein bioinformatischer Abgleich mehrerer Flagelline unterschiedlicher Organismen im Vergleich zu den Flagellinen FlaA und FlaB zeigt die Ähnlichkeit der Proteinsequenz im konservierten Bereich der Flagelline (in diesem Fall die N-

Die Flagelline FlaA und FlaB von *S. encadensis* MB 1 (Mitte) wurden bioinformatisch mit den Flagellinen des polaren

71 9 9 9 9 9 9

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd

100

[illegible]

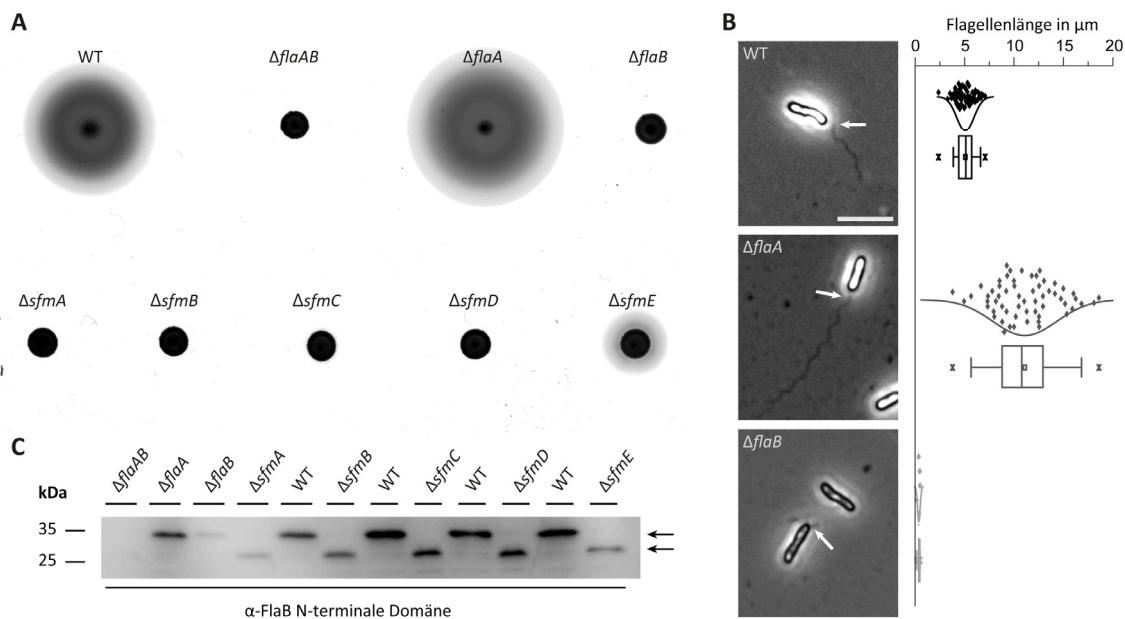


Abb. 29: Einfluss der Flagelline auf Motilität und Flagellenassemblierung (A und B), sowie die Funktion des *sfmABCDE*-Operons auf Motilität im Zusammenhang mit der Modifikation der Flagelline (A und C).

A Schwimmphänotypen der Flagellin-Deletionsmutanten und der Einzeldelentionsmutanten des *sfmABCDE*-Operons, im Vergleich zum Wildtyp in Weichagar (LB mit 0,2 % Agar). Jeweils 3 μl der logarithmisch kultivierten Stämme wurden auf die Weichagarplatte getropft und die radiale Ausbreitung nach 16 h Inkubation dokumentiert. **B** Qualitative und quantitative Analyse der Flagellierung der Stämme $\Delta flaA$ und $\Delta flaB$ verglichen mit dem Wildtyp. **Links:** Die Zellen von logarithmisch wachsenden Zellen der entsprechenden Kulturen wurde nach Flagellenfärbung mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Die weißen Pfeile deuten auf polare Flagellen. Abmessung des Balkens beträgt 5 μm . **Rechts:** Die quantitative Analyse der Längen der Flagellen von jeweils mindestens 70 Einzelzellen wurde mittels Metamorph bestimmt und als Boxplot dargestellt. **C** Western-Blot Analyse der Größe der Flagelline von *S. oneidensis* MR-1 in Abhängigkeit der Präsenz des *sfmABCDE*-Operons. Der primäre Antikörper detektiert die konservierte N-terminale Domäne von FlaB (und vermutlich FlaA). Der obere Pfeil deutet die molekulare Masse der modifizierten (36 kDa), der untere die Masse der unmodifizierten (28 kDa) Flagelline an.

(s. Abb. 29A). Entsprechend des starken Phänotyps einer $\Delta flaB$ -Mutante, produzierten die Zellen sehr kurze, oder keine Flagellen und auch Western-Blot Analysen bestätigten eine starke Reduktion in der produzierten Menge an Flagellin in der Mutante (s. Abb. 29B und C). Erstaunlicherweise konnte für eine $\Delta flaA$ -Mutante eine drastische Verlängerung der Flagelle beobachtet werden, die mit einer durchschnittlichen Länge von etwa 11 μm , den Wildtyp mit etwa 5 μm langen Flagellenfilamenten weit übertraf (s. Abb. 29B). Auffällig war allerdings auch die Verteilung der verschiedenen Längen des Filaments einer $\Delta flaA$ -Mutante. Die Länge der Flagellen des Wildtyps deckten einen relativ definierten Bereich zwischen 2,5 und 7,5 μm ab (s. Abb. 29B). Im Gegensatz dazu zeigten die Flagellen einer $\Delta flaA$ -Deletionsmutante sehr unterschiedliche Längen zwischen 2,5 und bis zu 18 μm (s. Abb. 29B). Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass in der Mutante möglicherweise das Flagellin FlaB überproduziert wird, was zu einer Akkumulation und damit zu einer Veränderung in der Filamentlänge führen könnte. Interessanterweise konnten Western-Blot Analysen diese Annahme nicht bestätigen (s. Abb. 29C). Somit lag den übermäßig verlängerten Flagellenfilamenten einer $\Delta flaA$ -Mutante keine erhöhte Verfügbarkeit der FlaB Flagellin-Monomere zugrunde. Dementsprechend wäre es möglich, dass FlaA indirekt oder direkt die Länge der Flagelle reguliert.

2.4.2 Die posttranslationale Modifizierung der Flagelline

Die bisher durchgeführten Experimente, zusammen mit den Ergebnissen, die bereits von Kim Dohlich durchgeführt wurden, zeigen, dass beide Flagelline auf unterschiedliche Art und Weise zu einer nativen Motilität von *S. oneidensis* MR-1 beitragen. Außerdem sind beide Flagelline posttranslational modifiziert, wobei die Modifizierung einen Unterschied von etwa 7 – 8 kDa im Laufverhalten einer SDS-PAGE ausmacht. Um die Modifizierung der Flagelline genauer zu untersuchen und um die modifizierten Aminosäuren der Flagelline zu determinieren, wurden Kooperationen mit Prof. Anne Dell in London und mit Prof. Parastoo Azadi in Georgia (USA) zur detaillierten MS-Untersuchung angestrebt. Zunächst musste jedoch ein Protokoll zur effizienten Aufreinigung der nativen Flagellenfilamente von *S. oneidensis* MR-1 entwickelt werden. Als Wildtyp-Stamm wurde in diesem Zusammenhang ein Stamm verwendet, dem die prominenten Zellanhänge Typ-IV-Pilus und MSHA-Pilus fehlen ($\Delta pilMNOPQ \Delta mshA$). Das aus der Aufreinigung resultierende Flagellenextrakt wurde anschließend tryptisch verdaut (s. Tabelle 6) und die daraus

Tabelle 6: Tryptischer Verdau von FlaA und FlaB von *S. oneidensis* MR-1. Gezeigt sind nur Peptide, welche potentielle Modifikationsstellen in Form von Serinen oder Threoninen aufweisen. Peptidmassen sind als $[M+H]^+$ angegeben und setzen sich aus den monoisotopischen Massen der Aminosäurereste zusammen. Potentiell modifizierte Aminosäuren sind unterstrichen.

Masse	Position	Sequenz
FlaA Peptide (durchschnittliche Gesamtmasse: 28674,12 Da / monoisotopische Gesamtmasse: 28656,55 Da)		
2076,0455	94 – 113	DLTIQ <u>S</u> ENGAN <u>S</u> IADLV <u>S</u> IK
1575,8085	168 – 183	I <u>S</u> L <u>S</u> VGALNNAI <u>S</u> ANR
994,5567	137 – 146	LLTGT <u>F</u> SAGK
FlaB Peptide (durchschnittliche Gesamtmasse: 28467,90 Da / monoisotopische Gesamtmasse: 28450,53 Da)		
2019,9829	94 – 113	DLIVQ <u>S</u> ENGAN <u>S</u> SADLSALK
1507,7710	168 – 183	<u>S</u> SL <u>S</u> VG <u>S</u> LGNI <u>I</u> SAAR
920,5199	137 – 146	LLAGGF <u>S</u> AGK

resultierenden Peptidketten massenspektrometrisch mittels LC-MS gekoppelter MALDI-TOF/TOF Analyse untersucht (Kooperation mit dem Labor von Anne Dell). Daraus ergaben sich sowohl für FlaA, als auch für FlaB drei Peptide, deren Serin- bzw. Threonin-Reste vermutlich modifiziert sind (vgl. Tabelle 6). Alle Peptidabschnitte liegen zum großen Teil innerhalb des variablen Bereichs der Flagelline.

Als nächster Schritt sollte nun determiniert werden, welche Serine oder Threonine innerhalb der Flagelline die Modifizierung tragen. Dies geschah in Kooperation mit dem Labor von Parastoo Azadi in Georgia (USA). Dazu wurde ebenfalls das isolierte Flagellin tryptisch verdaut und in diesem Fall nach LC-MS mittels LTQ-Orbitrap-ETD-MS (engl.: *linear ion trap with quadrupole Orbitrap coupled electron transfer dissociation mass spectrometry*) untersucht. Durch die Fragmentierung der Peptide, die dieser Methode zugrunde liegt, werden die Seitenketten der Modifizierung nicht abgespalten. Somit konnten – bei der damit einhergehenden MS-Auftrennung – die exakten Aminosäuren identifiziert werden, die in FlaA und FlaB modifiziert sind. In FlaA sind mindestens

	105	143	171	180	185
FlaB	ENGANSADLSALKAEKDQLANEIDEIGKTTAFGTTKLLA-----GGESAGKNFQVGAQDGEDIKVTVKASNKSSLVGS--LGNTTSAARAASLKK				
FlaA	ENGANSADLVSIKAEKDQLATEIDSIGNSTAFGNTKLLT-----GTFAGKVFQVGHQEGEDIKVTVKASNKTSLSVGA--LNNATSANRAASLAK				
Ssed_3076	ENGANSVDDIAALKAEKDQLVTEIDLIGTSTAFGNTKLLT-----GGESAGKNFQVGHQDGEDIKVTVKKTDKASLVNA--VVIATSANRAASLGA				
Ssed_3075	ENGANSADDIAALKAEKDQLVNEIDAIGTTAFGNTKLLT-----GTFAGKVFQVGHQDGEDIKVTVKKTDKASLVNA--VVIATSANRAASLGA				
Swoo_1609	ENGANSADDIAALKAEKDQLATEIDAIGTSTAFGNTKLLT-----GGESAGKTFQVGHQEGEDVKKTVKKTDKTSLSVGS--LALATSANRAASLGA				
Swoo_1608	ENGANSTEDLAALKAEKDQLATEIDNIGTSTAFGNTKLLQ-----GGESAGKIFQVGHQEGEDVKKVVVKKTDKTSLSVAA--LNNATSANRAASLAA				
Shew_1356	ENGANSADLQALKDEMDQLAEITAIGNSTAFGNTKLLT-----GEFSAGKLFQVGHQDGEDVTVSVGTLNAGVLVNS--LTVLTISAGRDAIGK				
Shew_1357	ENGANSADLQALKDEMDQLATEITAIGNTAFGNTKLLN-----GDFAGKTFQVGHQDGEDIKVSVGKSDAALVNS--LTVLTISAGRDAIGK				
Shal_1439	ENGANSDDIASIKKEIDALAGEITSIGNTAFGNTKLLM-----GDFAGKSFQVGHQKGEDITVKVQKVNASSLAVGS--LTLTNSANRQASLTK				
Shal_1438	ENGANSDDIASIKKEIDALATEITSIGNSTAFGNTKLLD-----GGESAGKSFQVGHQKGEDISVKVSKVNSSSLAVGS--LTLTNSANRQASLTK				
Sputw3181_1417	ENGANSDDLDIAIQLAEITAIGDSTAFGNTKLLT-----GNFSAGKTFQVGHQEGEDITISVGTNNAGTLMVST--LAIATSGGRSTALAA				
CN-32 FlaA₁	ENGANSDDLDIAIQLAEITAIGDSTAFGNTKLLT-----GNFSAGKTFQVGHQEGEDITISVGTNNAGTLMVST--LTIATSGGRSTALAA				
Shewana3_1332	ENGANSDDLDIAIQLAEITAIGDSTAFGNTLLMT-----GLFSTGKTFQVGHQEGEDITISVGTNNAGSLVNA--LAIASAGGRSTALAN				
Sputw3181_1418	ENGANSDDLDIAIQLAEITAIGTNTAFGTTKLLD-----GTFAGKTFQVGHQEGEDITISVAKTTASALKVGS--LDITG--ARAALAA				
CN-32 FlaB₁	ENGANSDDLTISIQLAEIDQLAEITAIGNTAFGTTKLLD-----GTFAGKTFQVGHQEGEDITISVSKTTASALKVGS--LDITG--ARAALAA				
Shewana3_1333	ENGANSDDLDIAIQLAEITAIGDNTAFGNTKLLD-----GTFAGKTFQVGHQEGEDITISVAKTTASALKVGS--LDITG--ARAALAA				
Sbal183_2880	ENGNSSTSDIGAISELDALATEITAIAINTAFGNTKLLD-----GSFAGKTFQVGHQNGEDIKVSVGKVTASAIKVNA--SVILVSTAGQRSLSLN				
Sbal_2935	ENGNSSTSDIGAISELDALATEITAIAINTAFGNTKLLD-----GSFAGKTFQVGHQNGEDIKVSVGKVTASAIKVNA--SVILVSTAGQRSLSLN				
Sbal183_2881	ENGNSSTSDIDAISELDALASEISAIAINTAFGNTKLLD-----GTFAGKTFQVGHQNGEDIKVSVGKVTASALKVQA--SVVVKVSTAAQRASLTN				
Sbal_2936	ENGANSSTSDIDAISELDALASEISAIAINTAFGNTKLLD-----GTFAGKTFQVGHQNGEDIKVSVGKVTASALKVQA--SVVVKVSTAAQRASLTN				
Shew185_2951	VNGANSSTSDKEALQAEIDQLTSEITAISNTAFGNTKLLS-----GGFT--GKSFQVGHQEGENISISISGTDATTLGVNA--LVVSSDTPAASAIIGA				
SOHN41_01154	VNGANSSTSDKDALQAEIDQLTSEITAISNTAFGNTKLLS-----GGFT--AKNFQVGHQEGETISITITATDATTGLVNA--LVVSSDGAASIAIAA				
Shew185_2948	VNGANSSTSDKDALQAEIDQLAEITAISNTAFGNTKLLS-----GGFT--AKNFQVGHQEGENISISISGTDATTLGVNA--LVVSSDGAASISGL				
Shew185_2950	VNGANSSTSDKDALQAEIDQLAEITAISNTAFGNTKLLS-----GGFT--AKSFQVGHQEGENISISISGTDAGTLGVDA--LTVSSDGAASISGL				
Shew185_2945	VNGANSSTSDKDALQAEIDQLAEITAISNTAFGNTKLLD-----SSFA--GKSFQVGHQEGENISISISGTDATTLGVNA--LAVSTDIASATGA				
Sput200_2750	TNGANSPSDIDALQAEYDELVAEIDAIGANTAFGNTKVLDD-----GTFAGKTFQVGHQEGEDIKVTVDIADMSG---VGT---AATGVVGTATLAL				
Sput200_2751	ENGANSSTDLKALQAEYDQLVTEIDAIGANTAFGNTKVLDD-----GTFAGKTFQVGHQEGEDIKVTVDIADMSG---VGT---AASGVVGTATLAL				
Sbal183_3871	ANGVNSAADLTALNDEFTQLNAEITRIVENTTYAGNKLFD---TGVLTSGTGVKFQIGAGTTETMDVK---LGAIP-KT VAG--TLTGGTANAALAL				
Sbal_3959	ANGVNSAADLTALNDEFTQLNAEITRIVENTTYAGNKLFD---TGVLTSGTGVKFQIGAGTTETMDVK---LGAIP-KT VAG--TLTGGTANAALAL				
Sputw3181_0484	ANGVNSAADLTALNDEFTQLNAEITRIVENTTYAGNKLFD---TGVLTSGTGVKFQIGAGTTETMDVK---LGAIP-KT VAG--TLTGGTANAALAL				
CN-32 FlaB₂	ANGVNSAADLTALNDEFTQLNAEITRIVENTTYAGNKLFD---TGVLTSGTGVKFQIGAGTTETMDVK---LGAIP-KT VAG--TLTGGTANAALAL				
Sbal183_3868	SGVNSSTADLKALDDEFKQLNAEITRIVENTTYAGNKLFDKATDGLVKG---VTFQIGSDAAEKMSVT---LGAID-KT VAGDLLT--AAANATIGA				
Sbal_3956	SGVNSSTADLKALDDEFKQLNAEITRIVENTTYAGNKLFDKATDGLVKG---VTFQIGSDAAEKMSVT---LGAID-KT VAGDLLT--AAANATIGA				
Sbal183_3869	ANGVNSADDLTALNDEFTQLNTEITRIIDNTTYAGNNLFA---KLEAG--VTFQIGAGTGEKLVVT---TTAIDDAALAGDLTIG--ANAAIAL				
Sbal_3957	ANGVNSADDLTALNDEFTQLNTEITRIIDNTTYAGNNLFA---KLEAG--VTFQIGAGTGEKLVVT---TTAIDDAALAGDLTIG--ANAAIAL				
Sputw3181_0483	ANGVNSADDLTALDAEFKELNKEISRIIDNTTYAGNNLFT---KLEAG--VTFQIGAGTAEITLAVT---TTAIDDAALAGDLTIG--ANAAITL				
CN-32 FlaA₂	ANGVNSADDLTALDAEFKELNKEISRIIDNTTYAGNNLFT---KLEAG--VTFQIGAGTAEITLAVT---TTAIDDAALAGDLTIG--ANAAITL				
Sbal183_3870	ANGVNSADDLTALDAEFQQLSLEVDRIAKNTTYAGNNLFT---AIDGG--VTFQIGAGTSETMKVT---SAAPVALANTVKLDGDNARLAITA				
Sbal_3958	ANGVNSADDLTALDAEFQQLSLEVDRIAKNTTYAGNNLFT---AIDGG--VTFQIGAGTSETMKVT---SAAPVALANTVKLDGDNARLAITA				
Spea_0063	ANGVNSADRAALNDEFTALTAEIMREKTYAGNDLFG---AISGN--VSFQIGAGSGETLTVSG--ASGITGIRSGIATLSGVKASTLGAQIGE				
Ssed_0057	ANGVNSADRAALNDEFTALKEVTRIVTDEYSGNKLFA---ELEAG--VTFQIGASSGETLDVT---TNAITAVAG---DLKAGAN--AALDL				
Shal_4260	ANGVNSAEDIKALGAEYKELNAEANRIDSTYEGGNKLF---ALDTG--VGFQIGASNTASEQLTV--KTDVAAVKTLFAG-EITETATAKAQIDN				
	** * * * * : : * * * * * * * : . . : : * * *				

Abb. 30: Bioinformatischer Abgleich der Flagellinsequenzen und Konservierung der modifizierten Aminosäurereste in FlaB gegenüber *Shewanella* spp. mit ähnlichen Flagellinen.

Der bioinformatische Abgleich von FlaA und FlaB von *S. oneidensis* MR-1 mit Flagellinsequenzen anderer *Shewanella* spp., deren Flagelline eine Länge zwischen 260 und 280 Aminosäuren besitzen, wurde unter Zuhilfenahme von ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/>) durchgeführt. Die modifizierten Serin-Reste S143, S171, S180, S185 sind in einigen Flagellinen konserviert, S105 in allen untersuchten *Shewanella* spp. Flagellinen. Die Flagelline von *S. oneidensis* MR-1 und *S. putrefaciens* CN-32 sind grau unterlegt. Putativ modifizierte, konservierte Serine sind rot unterlegt, Threonine blau. Locus-Tag Kennungen: Ssed: *S. sediminis*; Swoo: *S. woodyi*; Shew: *S. loihica*; Shal: *S. halifaxensis*; Sputw3181: *S. sp.* W3-18-1; Shewana3: *S. sp.* ANA-3; Sbal183: *S. baltica* OS183; Shew185: *S. baltica* OS185; Sput200: *S. putrefaciens* 200; SOHN41: *S. sp.* HN-41; Spea: *S. pealeana*. (*) = voll konservierter Aminosäurerest, (:) = konservierter Rest mit sehr ähnlichen Eigenschaften; (.) = konservierter Rest mit schwach ähnlichen Eigenschaften.

vier Serine (S143, S171, S180 und S185), in FlaB fünf Serine modifiziert (S105, S143, S171, S180 und S185) (s. Abb. 30). Aufgrund der gleichen Größe der Flagelline FlaA und FlaB, sowie des konservierten Serin-Rests, ist es jedoch wahrscheinlich, dass auch FlaA an fünf Serinen eine Modifizierung trägt (s. Abb. 30). Einige der modifizierten Serine sind in den Flagellinen der Vertreter des Genus *Shewanella* konserviert, unter anderem auch ein Teil in den Flagellinen FlaA₁ und FlaB₁ des polaren Flagellensystems von *S. putrefaciens* CN-32. Western-Blot Analysen deuteten zudem darauf hin, dass die Flagelline von *S. putrefaciens* CN-32 ebenfalls modifiziert sind, da die kalkulierte Masse der Flagelline geringer ist, als die detektierte (nicht gezeigt).

Um die mittels MS detektierten Modifizierungsstellen auf genetischer Ebene zu validieren, wurden Versionen von *flaB* erstellt, in denen die Codons für die Serine S105, S143, S171, S180 und S185 – entweder einzeln oder alle zusammen – zu einem, für Alanin codierenden Codon

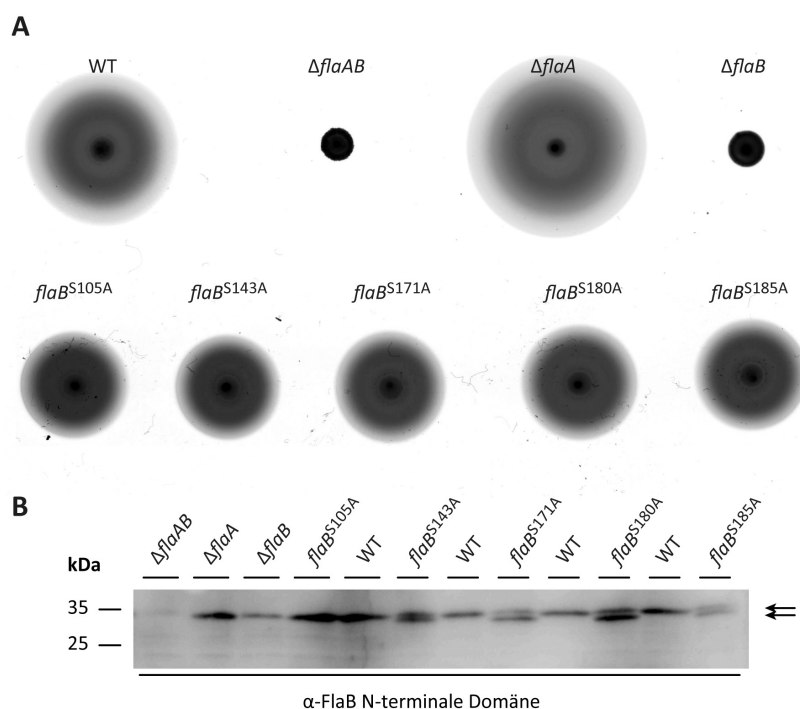


Abb. 31: Einfluss der Substitution einzelner modifizierter Serine auf die Motilität und posttranslationale Modifizierung von FlaB.

A Schwimmphänotypen der Flagellin-Deletionsmutanten und der Mutanten mit den Substitutionen S105A, S143A, S171A, S180A und S185A in FlaB im Vergleich zum Wildtyp in Weichagar (LB mit 0,2 % Agar). Jeweils 3 μ l der logarithmisch kultivierten Stämme wurden auf die Weichagarplatte getropft und nach 16 h Inkubation die radiale Ausbreitung dokumentiert. **B** Western-Blot Analyse der Größe der Flagelline von *S. oneidensis* MR-1 in den entsprechenden Substitutionsmutanten von FlaB. Der primäre Antikörper detektiert die konservierte aminoterminal Domäne von FlaB und FlaA. Das modifizierte FlaA ist als schwächere oberhalb laufende Bande zu erkennen, wenn in entsprechenden Stämmen eine Substitution in FlaB eine Veränderung der Masse nach sich zieht. Alle Substitutionen – bis auf S105A – ziehen eine erkennbare Veränderung der molekularen Masse der Flagelline nach sich. Der obere Pfeil deutet die molekulare Masse der modifizierten (36 kDa), der untere die Masse der weniger modifizierten (~35 kDa) Flagelline an.

substituiert sind. Die Aminosäure Alanin kann nicht modifiziert werden, da dieser die – für die O-Glykosylierung wichtige Hydroxylgruppe fehlt. Diese Versionen *flaB*^{S105A}, *flaB*^{S143A}, *flaB*^{S171A}, *flaB*^{S180A} und *flaB*^{S185A} wurden vektoriell codiert *in frame* in einen *flaB* Deletionsstamm in den nativen Genkontext eingeführt. Die daraus resultierenden Stämme konnten nun hinsichtlich des Einflusses der substituierten Serine auf ihre Motilität auf Weichagarplatten untersucht werden, aber natürlich in erster Linie, um das Molekulargewicht und damit die Wichtigkeit der einzelnen Serine bezüglich der Modifizierung zu überprüfen. Daraus ergab sich, dass alle fünf Serine für die Funktionalität der Flagelle von Bedeutung sind, aber keine der substituierten Aminosäurereste essentiell für die Funktion der Flagelle ist (s. Abb. 31A). In einer anschließenden immunologischen Untersuchung wurde das Molekulargewicht der Flagelline in den Mutanten untersucht, um die Wichtigkeit der einzelnen Serine bezüglich der Modifikation zu überprüfen. Die Analyse zeigte, dass wenigstens die Substitutionen S143A, S171A, S180A und S185A in FlaB zu einem signifikanten Massenunterschied führen (s. Abb. 31B). Man beachte, dass in den Substitutionsstämmen FlaA im nativen Zustand produziert wird, was die zusätzlich detektierte Bande in diesen Stämmen erklärt.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die genetische Validierung die MS-Analysen bestätigen konnten und somit feststeht, dass FlaB an fünf Serinen modifiziert ist und jede Modifizierung zur Funktionalität der Flagelle beiträgt.

2.4.3 Die strukturelle Analyse der Modifizierung

Für eine detaillierte Analyse der posttranslationalen Modifizierung des Filaments von *S. oneidensis* MR-1 wurde ebenfalls mit der Arbeitsgruppe von Prof. P. Azadi kooperiert. Die genauere Analyse geschah zum einen mithilfe der, durch die LTQ-Orbitrap-ETD-MS generierten Daten und zum anderen, durch die nachfolgend durchgeführten Analysen mittels einer weiteren MS-Methode, der HCD-MS (engl.: *higher-energy collisional dissociation mass spectrometry*). Die LTQ-Orbitrap-ETD-MS, wie auch die HCD-MS Daten wurden sämtlich von Mayumi Ishihara und Mitarbeitern des Labors von Prof. P. Azadi am CCRC (Georgia, USA) angefertigt und interpretiert. Die Kombination der Daten der verschiedenen Peptide aus beiden Herangehensweisen ließ die Ableitung der Masse der Modifizierung zu, die direkt an den jeweiligen Serinen gebunden ist. Die Modifizierung besitzt eine molekulare Masse von 538 Da und ist vermutlich aus mehreren Untereinheiten aufgebaut (s. Abb. 32). In der HCD-MS Analyse konnten prominente Ionen der Peptidfragmente des tryptischen Peptids LLAGGFSAGK entdeckt werden, die – neben dem Verlust der Aminosäuren – jeweils einen Gewichtsverlust von 538 Da zeigten (s. Abb. 32A). Zusätzlich tauchten hier, aber auch in anderen Untersuchungen, Ionen mit niedrigerer Masse auf, die sich vermutlich aus der Modifizierung zusammensetzen, oder Teilfragmente der Modifizierung darstellen. So konnten beispielsweise prominente Ionen mit einem Molekulargewicht von 275 Da und 257 Da entdeckt werden, wobei letzteres vermutlich durch den Verlust eines H₂O-Moleküls entstand. Da diese Ionen in allen Analysen auftauchen, lässt sich mutmaßen, dass dieser Rest die Basis der Modifizierung bildet und über O-glykosidische Bindung an die jeweiligen Serine gebunden ist. An die Basis der Modifizierung bindet vermutlich ein weiterer Rest mit einer Masse von 264 Da, der sich wiederum aus kleineren Untereinheiten zusammensetzt (vgl. Abb. 32B). Aus diesen Daten lässt sich die hypothetische Struktur der Modifizierung der Flagelle von *S. oneidensis* MR-1 ableiten. Die Basis der Modifizierung könnte dabei das Sialinsäurederivat N-Acetyl-Pseudaminsäure sein, was anhand der molekularen Masse von 275,12376 Da des, in der HCD-MS Analyse, entdeckten Ions vorhergesagt werden kann (vgl. Abb. 32C). Allerdings ist eine genauere Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie (engl.: *nuclear magnetic resonance*) unausweichlich, um eine exakte Struktur der gesamten Modifizierung zu erhalten.

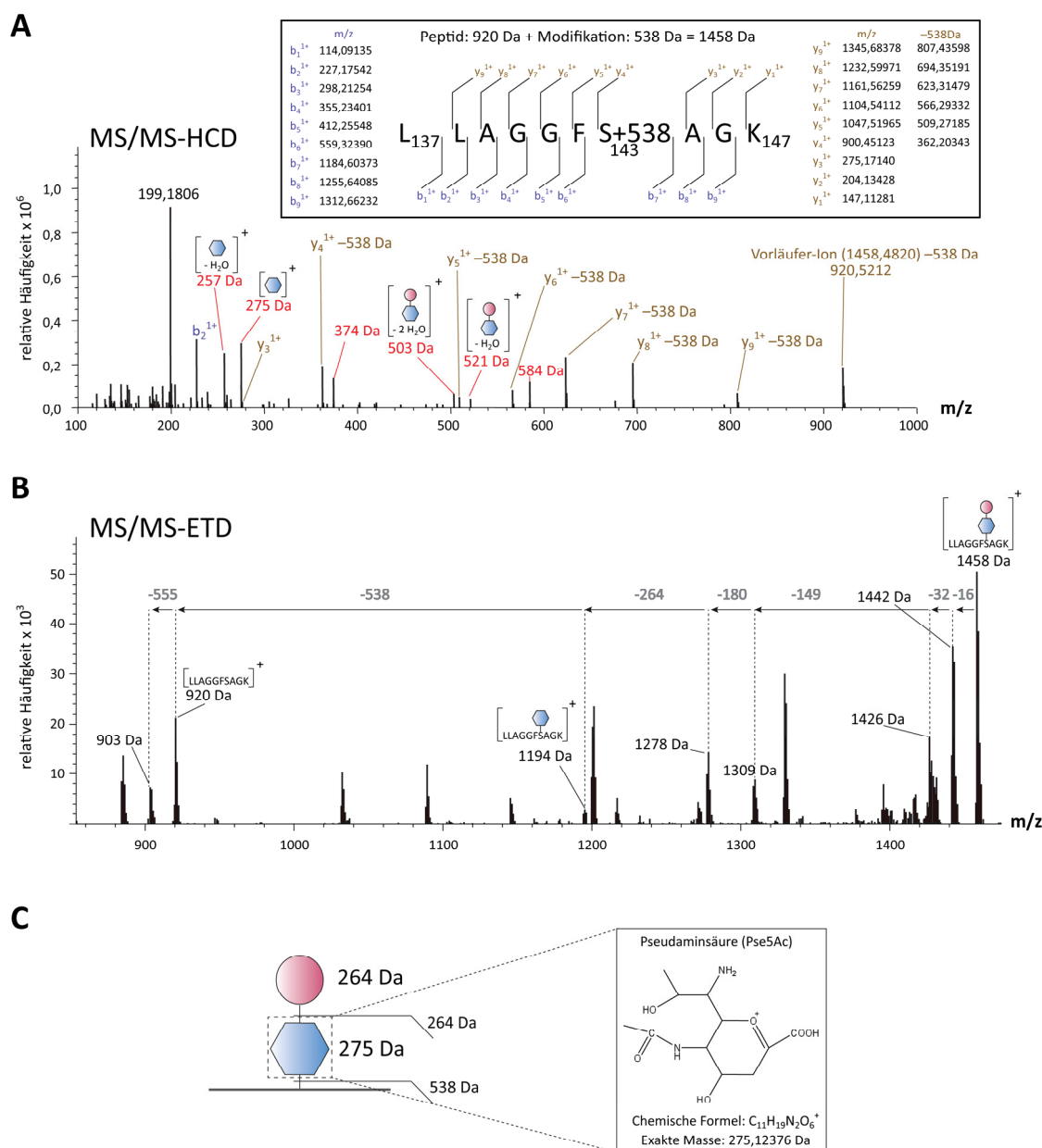


Abb. 32: Genauere Analyse der Eigenschaften der Modifizierung mittels HCD- und ETD-MS anhand des Peptids L₁₃₇LAGGFSAGK₁₄₇ von FlaB.

A Massenspektrogramm einer MS/MS-HCD Analyse. Die X-Achse gibt den Quotient aus Masse zu Ladung (m/z) der Ionen an. Die y-Achse gibt die relativen Intensitäten der detektierten Ionen an. Die Toleranzgrenze für das Substrat der Analyse war das tryptische Peptid L₁₃₇LAGGFSAGK₁₄₇ von FlaB. Die Analyse der b- und y-Ionen des Peptids zeigt den Verlust eines 538 Da-Restes. Rot markiert sind Massenintensitäten, die vermutlich von der 538 Da-Einheit herrühren, oder aus dieser bestehen. **B** Massenspektrogramm einer MS/MS-ETD Analyse. Die Achsen sind entsprechend dem Spektrogramm in **A** skaliert. Das Spektrogramm zeigt die monoisotopischen Werte des tryptischen Peptids L₁₃₇LAGGFSAGK₁₄₇ von FlaB in modifizierter Form und entsprechenden Fragmentierungs-Formen der Modifizierung. Die schwarzen Pfeile mit den dazugehörigen grauen Ziffern zeigen den Massenverlust der fragmentierten Zwischenstufen des (modifizierten) Peptids, dessen putative Strukturen als monoisotopische Schemata gezeigt sind. **C** Schema der Modifizierung der Flagelline. Das Schema wurde aus den kombinierten Fragmenten der MS/MS-HCD und MS/MS-ETD Analyse zusammengesetzt. Ein 275 Da-Rest bildet vermutlich die Basis der Modifizierung. Eine Vorhersage der Struktur mittels Chemdraw des entsprechenden Wertes aus einem MS/MS-HCD Spektrogramm von 275,12376 Da stimmt exakt mit der Masse von N-Acetyl-Pseudaminsäure (PseNAc) überein.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die Flagelle von *Shewanella oneidensis* MR-1 tatsächlich an fünf Serinen innerhalb der variablen Region der Flagelline FlaA und FlaB modifiziert wird und diese Glykosylierung von essentieller Wichtigkeit für die Funktionalität der Flagelle ist. Weitere Versuche müssten zeigen, ob die Modifizierung eine Rolle für die Stabilität des Flagellenfilaments, bzw. für die Exporteffizienz oder Stabilität der Flagellinmonomere spielt.

3 Diskussion

3.1 Glykosylierung des Flagellenfilaments von *Shewanella oneidensis* MR-

1

Flagellen sind effektiv funktionierende und vielseitige Organellen, die Bakterien unter verschiedensten Bedingungen die Fortbewegung ermöglichen. Zusätzlich dazu spielen Flagellen für die Virulenz vieler Organismen eine große Rolle [142, 260]. So nutzt das ϵ -Proteobakterium *Campylobacter jejuni* das Typ III Sekretionssystem der Flagelle, um eine Reihe von Virulenzfaktoren zu sekretieren, die für das Eindringen in Wirtszellen notwendig sind [167, 168, 289]. Der Export dieser Faktoren, ist vermutlich über konservierte aminoterminalen Bereich der Proteine reguliert, wie zuletzt für die Flagelline FlaA und FlaB von *C. jejuni* gezeigt wurde [250]. Die Exporteffizienz der Flagelline hat Auswirkungen auf die Filamentlänge und die Motilität von *C. jejuni* [250]. Die O-glykosidische Modifizierung der Flagelle spielt als weiterer Faktor für die Virulenz von *Campylobacter* spp., aber auch für die Virulenz anderer Bakterien, eine wichtige Rolle [100, 102, 200, 346].

Campylobacter spp. besitzen die am stärksten modifizierten Flagelline, wobei deren Glykosylierung etwa 10 % des Gesamtgewichts der Flagelline ausmachen kann [230, 356]. Das Flagellin von *C. jejuni* 81-176 ist an 19 Serinen oder Threoninen posttranslational mit den Sialinsäure-ähnlichen Zuckern [316] Pseudaminsäure (Pse5Ac7Ac), mit einer Masse von 316 Da, und dessen Acetamidin-Derivat (Pse5Ac7Am), mit einer Masse von 315 Da modifiziert [356]. Diese Glykosylierung ist sowohl für die Assemblierung der Flagelle, als auch für die Motilität und Virulenz dieses Organismus von entscheidender Bedeutung [101, 102, 192, 202, 230, 356]. In anderen *Campylobacter* spp. sind Flagelline auch mit verschiedenen Derivaten der Legionaminsäure (LegAm, 315 Da) modifiziert, einem weiteren Vertreter der Sialinsäure-artigen Zucker, der strukturelle Homologie zu Pseudaminsäure aufweist. Auch wenn alle posttranslationalen Modifizierungen der *Campylobacter* spp.-Flagelline auf PseAc und LegAm basieren, entsteht durch die Variabilität der verschiedenen Derivate dieser Zucker und durch deren Oberflächen-exponierte Lage [280], die serologische Spezifität der einzelnen Stämme [201, 203].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass *S. oneidensis* MR-1 zwei Flagelline besitzt, ein Hauptflagellin FlaB und ein Nebenflagellin FlaA. Während FlaB essentiell für den Aufbau des Filaments ist, könnte FlaA eine Rolle in der Regulation der Flagellenlänge zukommen. Beide Flagelline sind zudem an mindestens vier, aber wahrscheinlich fünf Serin-Resten posttranslational modifiziert. Alle fünf modifizierten Serin-Reste in FlaB sind wichtig, nicht aber essentiell, für die Motilität von *S. oneidensis* MR-1. Die Modifizierung setzt sich aus zwei Einheiten zusammen: einer 274 Da-Einheit, und einer 264 Da-Einheit. Bei der 274 Da-Einheit handelt es sich vermutlich um ein Pseudaminsäure-Derivat Pse5Ac, welches statt zwei nur eine Acetylgruppe trägt. Die volle Struktur der 274 Da-Einheit, wie auch die Eigenschaft der 264 Da-Einheit, konnten jedoch bisher nicht aufgeklärt werden. Die MS/MS-ETD-Analysen lassen jedoch vermuten, dass

die 264 Da-Einheit an der Pse5Ac-Einheit adhärert, um zusammen eine Modifizierung mit der Größe von 538 Da zu bilden.

3.1.1 Funktion der Flagelline FlaA und FlaB

Die Gene der beiden Flagelline FlaA und FlaB werden aufgrund der unterschiedlichen Promotorsequenzen vermutlich differentiell reguliert. FlaB ist das Hauptflagellin in *S. oneidensis* MR-1 und dessen Verlust führt zu einer sehr stark eingeschränkten radialen Ausbreitung in Weichagarplatten. Im Gegensatz dazu steigert die Deletion von *flaA*, im Vergleich zum Wildtyp, die Motilität der Zellen in Weichagarplatten und erstaunlicherweise zeigten Flagellenfärbungen einer *flaA*-Mutante signifikant verlängerte Flagellenfilamente. Wie weitere Analysen zeigten, beruhte dieser Phänotyp allerdings nicht auf einer Überproduktion von FlaB. Somit könnte FlaA einen regulatorischen Effekt auf die Filamentlänge in *S. oneidensis* MR-1 haben, der sich aus einem möglichen Unterschied der Exporteffizienz von FlaA und FlaB begründen könnte. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ist die N-terminale Sequenz des Flagellins (FliC) zwischen der Aminosäure 22 und 47 entscheidend für die Exporteffizienz von FliC [375, 407]. Ein Unterschied bezogen auf die Effizienz des Exports von FlaA und FlaB ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da sich die Sequenz der beiden Flagelline in der fraglichen Region lediglich durch eine Aminosäure unterscheidet. Dennoch müsste eine qualitative Untersuchung der Exportsequenz der *S. oneidensis* MR-1 Flagelline vorangehen, um anschließende quantitative Analysen der Exporteffizienz durchführen zu können. Abgesehen von diesem direkten Einfluss, könnten FlaA und FlaB einen indirekten Einfluss auf sekundäre Faktoren haben, die den Flagellin-Export regulieren. In *Bacillus subtilis* beispielsweise bindet ein Hexamer von FliW – ein Flagellen-Assemblierungsfaktor – direkt an Flagellin-Monomere, um sowohl die Transkription des Flagellins über den Kohlenstoffregulator CsrA (engl.: *carbon storage regulator*), als auch direkt den Export des Flagellins zu regulieren [244, 245]. Der Nutzen einer solchen Regulierung kann eine Möglichkeit zur Anpassung der Zellen an wechselnde Bedingungen, wie z.B. Viskosität oder pH-Änderungen in der Umgebung, darstellen, die unterschiedliche Stabilitäts-Eigenschaften des Flagellenfilaments erfordern könnten [74, 77, 80, 162, 188].

3.1.2 Funktion einer konservierten Genregion in der posttranslationalen

Modifizierung der Flagelline in *Shewanella* spp.

Alle bislang untersuchten Bakterien, in denen posttranslationale Modifikationen der Flagelline gezeigt wurden, modifizieren diese mittels O-glykosidischer Bindung an einen Serin- oder Threonin-Rest [135, 200]. Die Glykosylierung der Flagelline findet bereits im Cytoplasma statt, aus dem sie nachfolgend ungefaltete über den T3S-Apparat der Flagelle an die Spitze des wachsenden Flagellenfilaments transportiert werden [78, 200, 318]. Für die Biosynthese der spezifischen Zucker und die posttranslationale Modifizierung der Flagelline mit diesen Zuckern benötigen Bakterien ein Enzym-Repertoire, wie beispielsweise Glykosyltransferasen und Synthasen [78, 193, 263, 314, 316, 318, 347, 348]. In *Campylobacter* spp. existiert ein etwa 50 Gene umfassender, Spezies-spezifischer Genomabschnitt, die sogenannte Glykosylierungs-Insel (GI). Diese GI-Region enthält unter anderem Gene, deren Produkte homolog zu Enzymen der Sialinsäure-Biosynthese sind – wie zum

Beispiel NeuA, NeuB und NeuC – und deren Rolle in der Pseudaminsäure- und Legionaminsäure-Synthese aufgeklärt werden konnte [98, 229, 230, 313, 315, 332]. Die Biosynthese-Kaskade der Pseudaminsäure benötigt das Zusammenspiel von sechs Enzymen – PseB (eine C5-Epimerase/C4,6 Dehydratase), PseC (eine Aminotransferase), PseH (eine N-Acetyltransferase), PseG (eine UDP-Zucker Hydrolase), PseI (eine Pse5Ac7Ac Synthase oder Aldolase) und PseF (eine CMP-Pse5Ac7Ac Synthetase) [53, 230, 315]. Auch in einem Vertreter der γ -Proteobakterien, *Aeromonas hydrophila* AH-3, konnte ein Pseudaminsäure-Derivat als basale Modifizierung der polaren und lateralen Flagellen identifiziert werden [392]. In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass homologe Proteine zu PseB und PseF aus *C. jejuni* einen essentiellen Bestandteil der posttranslationalen Modifizierung der Flagelline darstellen [392].

Die Modifizierungsregion von *S. oneidensis* MR-1, die sich stromabwärts der Flagellengenregion befindet, umfasst unter anderem auch das bereits im Vorfeld identifizierte *sfmABCDE*-Operon (vgl. Abb. 27), welches für Proteine codiert, die eine essentielle Aufgabe in der Modifizierung der Flagelline übernehmen. Die Gene *sfmABCD* sind außerdem notwendig für die Motilität von *S. oneidensis* MR-1. Interessanterweise befinden sich innerhalb der Modifizierungsregion in *S. oneidensis* MR-1 zudem Gene, deren Genprodukte homolog zu PseB bzw. PseC aus *Campylobacter* spp. sind und ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Glykosylierung von FlaA und FlaB in *S. oneidensis* MR-1 übernehmen [398]. PseB von *C. jejuni* ist zu 67 % sequenzidentisch und zu 80 % ähnlich mit SO_3271 (PseB) aus *S. oneidensis* MR-1. Das *C. jejuni* PseC zeigt mit 37 % Identität und 57 % Ähnlichkeit ebenfalls ein relativ hohes Maß an Sequenzhomologie zu SO_3270 (PseC). Dementsprechend ist es möglich, dass in *S. oneidensis* MR-1 ein ähnliches System zur Modifizierung von Flagellinen vorliegt, wie in *Campylobacter* spp. oder *Helicobacter* spp.. SfmA (SO_3261) ist ein mäßig konserviertes Homolog zu PseI (31 % Identität/49 % Ähnlichkeit). Der zentrale Bereich von Maf-2 (SO_3259, *motility accessory factor*) weist schwache Ähnlichkeit zu der PseAm-Transferase PseD (25 % Identität/40 % Ähnlichkeit), bzw. der PseAc-Transferase PseE (26 % Identität/42 % Ähnlichkeit) auf. Ähnliches trifft für den Vergleich des *S. oneidensis*-Maf (SO_3273) mit dem *C. jejuni*-Maf zu (24 % Identität/38 % Ähnlichkeit), das ein Ortholog zu PseD und PseE in *C. jejuni* darstellt. Dies könnte bedeuten, dass sowohl Maf als auch Maf-2, an der Glykosylierung der Flagelline in *S. oneidensis* MR-1 beteiligt sind und als Glykosyltransferasen fungieren. Tatsächlich scheint sowohl Maf-2, aber vor allem Maf in einigen *Shewanella* spp. und weiteren Proteobakterien funktionell konserviert zu sein (vgl. Abb. 33). Die Gene der ersten Enzyme der PseAc-Biosynthese, PseB und PseC [102], sind ebenfalls in einer größeren Zahl von *Shewanella* spp. und sogar in zwei nicht-*Shewanella* Vertretern *Pelobacter carbinolicus* (δ -Proteobakterium) und *Thiomicrospira crunogena* funktionell konserviert. Der größte Teil der Modifizierungsregion, darunter auch das *sfmABCDE*-Operon, ist jedoch lediglich in *Shewanella baltica* OS155 konserviert. Homologe zu weiteren wichtigen Komponenten der PseAc-Biosynthese wie PseF, PseG und PseH sind in *S. oneidensis* MR-1 über Sequenzvergleiche nicht auffindbar. Dies lässt vermuten, dass die Glykosylierungs-Maschinerie in den verglichenen Spezies ähnlich funktionieren könnte, die Biosynthese der Modifizierung selbst jedoch starke Unterschiede aufweist. Eine funktionelle Annotation der Gene zeigt auch, dass einige *Shewanella* spp. PseAc-Derivate, während andere Organismen stattdessen LegAm-Derivate produzieren könnten (vgl. Abb. 33). Allerdings kann an dieser Stelle nur bedingt eine Aussage über die Funktion und Aktivität der Gene, bzw. Genprodukte, der gezeigten Spezies getroffen werden.

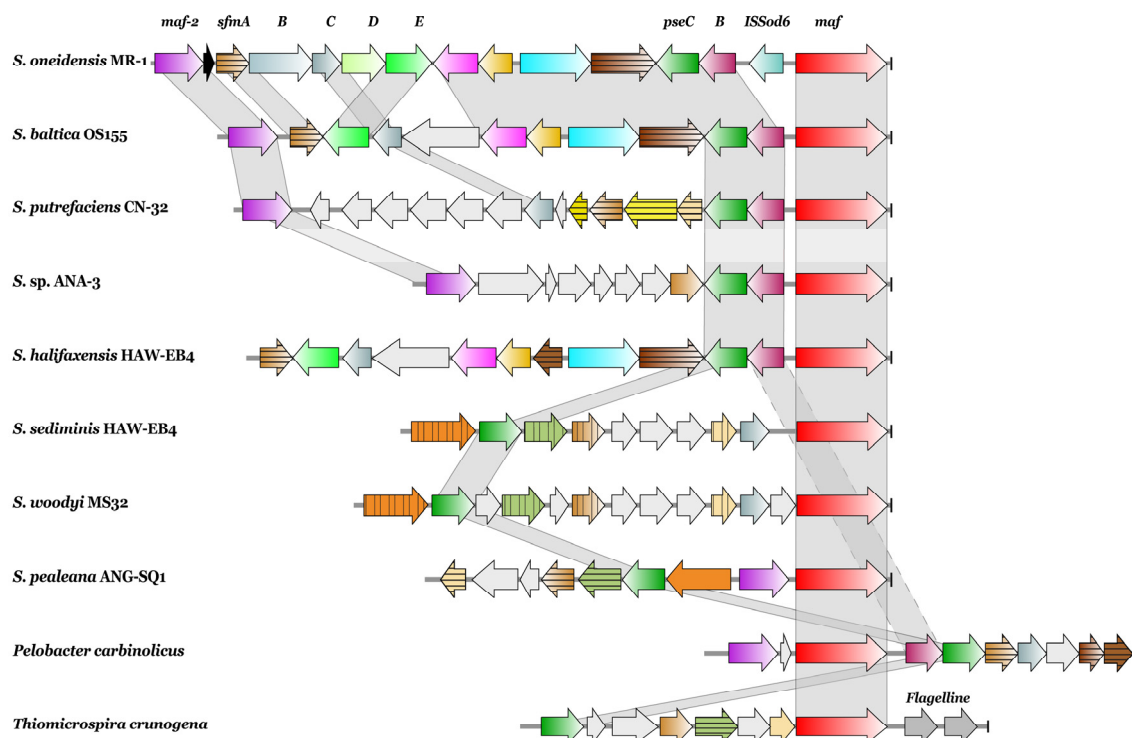


Abb. 33: Konservierung der Modifizierungsregion von *S. oneidensis* MR-1.

Vergleichende Analyse des Genomkontexts anhand des *S. oneidensis* MR-1 *maf-2* – *maf* Genlocus. Farbgebung der einzelnen Gene nach funktioneller Ähnlichkeit der Genprodukte. Konservierte Gene oder Genregionen zwischen Stämmen sind über graue Verbindungsbalken gekennzeichnet. Horizontale Striche innerhalb der schematischen Darstellung der Gene deuten eine putative Rolle des Genprodukts in der Biosynthese von PseAc an. Vertikale Striche geben die putative Funktion der Genprodukte in der LegAm-Biosynthese wieder. Hellgrau markierte Gene codieren für hypothetische Proteine. Die Grafik wurde mithilfe des Seed Viewers (<http://seed-viewer.theseed.org/>) erstellt.

Zukünftige genetische und biochemische Versuche könnten zeigen, ob Maf und Maf-2 tatsächlich an der Modifizierung der Flagelline in *S. oneidensis* MR-1 beteiligt sind. Zusätzlich könnten Deletionen von *maf* und *maf-2* in anderen *Shewanella* spp., wie zum Beispiel in *S. putrefaciens* CN-32, zeigen, ob die Genprodukte auch hier eine Rolle in der posttranslationalen Modifikation übernehmen. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen könnten möglicherweise Aufschluss über einen allgemeinen Mechanismus der Glykosylierung von Flagellinen in *Shewanella* spp. und anderen Organismen geben.

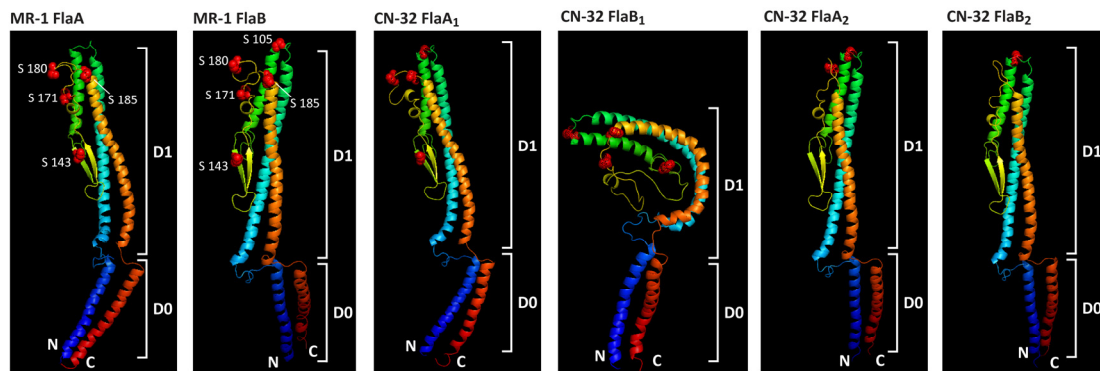
3.1.3 Die Modifizierung von FlaA und FlaB

Mit Hilfe von verschiedenen massenspektrometrischen Analysen konnten mindestens vier, wahrscheinlich aber eher fünf Aminosäurereste identifiziert werden, an denen die zwei Flagelline FlaA und FlaB von *S. oneidensis* MR-1 modifiziert werden. Diese, in vielen *Shewanella* spp. konservierten Reste, befinden sich vermutlich jeweils an exponierten Stellen, zwischen den strukturell konservierten D0- und D1-Domänen der Flagelline (vgl. Abb. 34A). Nur das Serin an Position 105 befindet sich innerhalb der aminoterminalen D1-Domäne. Interessanterweise ist gerade dieses Serin 105 in allen untersuchten *Shewanella* spp. mit homologen Flagellinen konserviert, obwohl dessen Substitution in FlaB keinen signifikanten Masse-Unterschied im Vergleich zu einem

vollständig modifizierten Protein verursachte. Dennoch ist das Serin wichtig für die Funktionalität der Flagelle, wie ein Motilitätsassay auf Weichagarplatten zeigte, wenngleich die Möglichkeit besteht, dass dieses Serin – im Hinblick auf die Lokalisation zwischen zwei Alpha-Helices des konservierten N-terminalen Bereichs (vgl. Abb. 34A) – weniger oft, bzw. mit einer bisher nicht detektierten Modifizierungs-Einheit modifiziert sein könnte. Die LC-MS-Untersuchungen ergaben, dass die Modifizierung an jedem Serin eine Masse von 538 Da besitzt und vermutlich aus zwei Untereinheiten besteht – einer 274 Da- und einer 264 Da-Einheit (vgl. Abb. 32C). Die 274 Da-Einheit stellt wahrscheinlich ein einfach-acetyliertes PseAc dar und besitzt mehrere reaktive Gruppen, wie zum Beispiel mindestens eine Hydroxylgruppe oder Carboxylgruppe. Zudem beinhaltet die 274 Da-Einheit mindestens zwei Aminogruppen, von der eine die beobachtete Acetylgruppe trägt (Mayumi Ishihara, persönliche Kommunikation). Zwar gibt es keine genaueren strukturellen Charakteristika und schematische Vorhersagen für die 264 Da-Einheit, jedoch setzt sich ein Teil der Masse vermutlich aus zwei Methylgruppen (jeweils 14 Da) zusammen (Mayumi Ishihara, persönliche Kommunikation). Sowohl SfmD, als auch SO_3266 und SO_3267, besitzen Methyltransferasedomänen und könnten demnach in die Methylierung der Modifizierung involviert sein (vgl. Tabelle 5). Für eine genauere Analyse der Struktur der 274 Da-, wie auch der 264 Da-Modifizierung, müssen NMR-Analysen der aufgereinigten Glykosylierung folgen.

Generell werden Flagelline innerhalb der variablen Region – zwischen der konservierten aminoterminalen-D1 und carboxyterminalen-D1 Domäne – posttranslational modifiziert, was dazu führt, dass ein Großteil der Modifikationen sich anschließend in exponierter Position an der Außenseite des Filaments befindet [308, 310, 311, 356, 392]. Auch in FlaA und FlaB von *S. oneidensis* MR-1 liegen alle, bis auf das Serin 105, modifizierten Aminosäure-Reste innerhalb der kurzen variablen Region der Flagelline und eine dreidimensionale Darstellung mittels des Phyre2-Programms (*protein homology/analogy recognition engine V 2.0*, [148]) zeigte, dass die modifizierten Reste der beiden *S. oneidensis* MR-1 Flagelline vermutlich Oberflächen-exponiert sind (vgl. Abb. 34A). Falls auch die Flagelline von *S. putrefaciens* CN-32 modifiziert werden, könnten die Modifizierungen der Flagelline ebenfalls die Außenseite der Flagellenfilamente dekorieren (vgl. Abb. 34A). Eine bioinformatische Analyse von Flagellinen aus *Shewanella* spp., die keine Modifizierungsregion besitzen, zeigte, dass deren Flagelline Aminosäure-Sequenzlängen von etwa 400 – 480 Aminosäuren aufweisen. Verglichen damit besitzen die Flagelline der *Shewanella*-Vertreter mit einer Modifizierungsregion lediglich eine Länge von etwa 260 – 280 Aminosäuren. Allerdings unterscheiden sich die Flagelline hauptsächlich in der Länge der variablen Region, während sowohl die D0-, als auch die D1-Domänen in beiden Flagellin-Typen konserviert sind. Eine 3D-Darstellung der langen Flagelline weist Ähnlichkeit zu der Struktur des *S. enterica* serovar Typhimurium FliC auf (vgl. Abb. 34B, Abb. 5). Die variable Region der Flagelline bildet daher mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls die Oberfläche der Filamente. Es scheint demnach, dass ein Teil der *Shewanella* spp. lange Flagelline besitzt, die vermutlich nicht modifiziert werden, während der andere Teil der *Shewanella* spp. kurze Flagelline hat und diese modifiziert. Im Gegensatz dazu besitzt *S. pealeana* lange Flagelline nebst einer Modifizierungsregion und stellt somit eine Ausnahme dar. Allerdings sind die Flagelline von *S. pealeana* kleiner, als beispielsweise Flagelline von *S. piezotolerans* WP3 oder *S. sp.* MR-7. Wenn ein Zusammenhang zwischen der Präsenz einer Modifizierungsregion und Flagellinen mit kurzen variablen Bereichen besteht, könnte *S. pealeana*

A



B

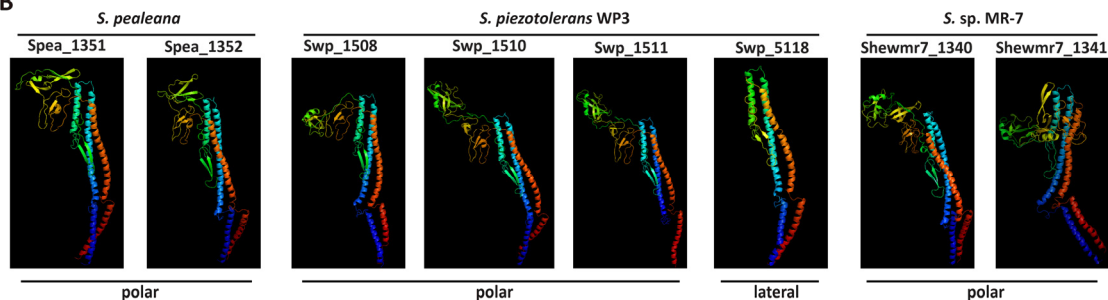


Abb. 34: 3D-Struktur von *Shewanella*-Flagellinen.

A Dargestellt sind die dreidimensionalen Strukturen der *S. oneidensis* MR-1 und *S. putrefaciens* CN-32 Flagelline. Die konservierten Alpha-Helices sind mit D0, bzw. mit D1 beschriftet. In den MS-Analysen identifizierte modifizierte Serin-Reste sind in MR-1 FlaA und MR-1 FlaB rot markiert und beschriftet. Konservierte, putative modifizierte Aminosäure-Reste sind in den CN-32 Flagellinen ebenfalls rot markiert. **B** Dreidimensionale Darstellung von Flagellinen aus *S. pealeana* und zwei *Shewanella* spp. ohne Modifizierungsregion. Das laterale Flagellenfilament von *S. piezotolerans* WP3 besitzt ähnliche strukturelle Eigenschaften, wie die polaren Flagelline von *S. oneidensis* MR-1 und *S. putrefaciens* CN-32. Die variable Region der polaren Flagelline ist dagegen erheblich größer. Die Strukturen wurden in den Regenbogenfarben markiert, jeweils am N-Terminus mit Blau beginnend und mit Rot am C-Terminus endend. Die dreidimensionalen Strukturen der Flagelline wurden mithilfe des Phyre²-Programms (protein homology/analogy recognition engine V 2.0, [148]) erstellt.

in der Anpassung begriffen sein und die variable Region des Flagellins weiter verkürzen. Interessanterweise besitzen *P. carbinolicus* und *T. crunogena* ebenfalls Flagelline mit Längen zwischen 270 und 290 Aminosäuren, die große Ähnlichkeit zu den Flagellinen FlaA und FlaB von *S. oneidensis* MR-1 aufweisen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Glykosylierung der Flagelline in *Shewanella* spp. als Ersatz für eine fehlende variable Region fungieren könnte und so die Stabilität, aber auch die Variabilität der Flagellen dieser Shewanellen gewährleistet. Zudem wäre es möglich, dass auch in Organismen wie *S. oneidensis* MR-1 die Glykosylierung, über die Stabilisierung der Flagelle hinaus, Spezies-spezifische Funktionen erfüllt und eine Rolle für die Motilität unter sich verändernden Bedingungen oder für die Besiedelung von Oberflächen spielt.

Eine mögliche Funktion der Modifizierung

Mutanten von *S. oneidensis* MR-1, die Flagelline nicht mehr modifizieren können, zeigen schwere Motilitäts-Defekte, die auf ein Fehlen, oder extreme Verkürzung des Flagellenfilaments

zurückzuführen sind (Kim Dohlich, unveröffentlicht). Demnach bezieht sich die Funktion der Modifizierung der Flagelline primär auf die Assemblierung der Flagelle, was auch für viele weitere Organismen, wie *Campylobacter* spp., *Aeromonas* spp. und *Helicobacter* spp. zutrifft [200]. Allerdings bleibt die Frage, ob bereits die Polymerisation der Flagelline zu einem Filament, oder aber die Stabilität des Flagellenfilaments durch die fehlende Modifizierung gestört ist. Eine weitere wichtige Funktion der posttranslationalen Modifizierung der Flagelline bezieht sich auf die Virulenz verschiedener Organismen, wie zum Beispiel die Pathogenität gegenüber Wirtszellen, oder deren Kolonisierung [14, 284, 311, 356]. Bislang ist lediglich ein *Shewanella*-Vertreter als potentiell pathogenes Bakterium bekannt – *Shewanella algae* [119]. Leider existieren bis dato keine Genomsequenzierungen dieser Spezies, was eine Aussage über putative Modifikation der Flagelline von *S. algae* unmöglich macht.

Eine genaue Untersuchung des phylogentischen Stammbaums von *Shewanella* lässt einen augenscheinlichen Zusammenhang zwischen der Präsenz eines putativen Flagellinmodifikationssystems und der Präsenz eines dualen Flagellensystems in manchen Organismen offenbar werden. Glykosylierungen könnten demnach auch für die lateralen Flagellensysteme der entsprechenden *Shewanella* spp. von Bedeutung sein, ähnlich zu einigen *Aeromonas* spp., deren laterale Flagellen ebenfalls glykosyliert werden [89, 263, 284, 392].

Im Rahmen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung der Flagelle möglicherweise auch in anderen *Shewanella* spp., zumindest aber in *S. oneidensis* MR-1, eine essentielle Rolle für die Beweglichkeit der Zellen spielt. Welche spezifischen Aufgaben die Modifizierung dabei übernehmen könnte – wie beispielsweise die Stabilität des Filaments, den Schutz vor proteolytischem Abbau oder als Adhäsionsfaktor – könnte in zukünftigen Untersuchungen weiter analysiert werden. Zudem wäre es interessant zu determinieren, welche Rolle die Faktoren der Glykosylierungs-Maschinerie übernehmen, die in anderen *Shewanella* spp. ebenfalls konserviert sind und ob diese Spezies – wie zum Beispiel *S. putrefaciens* CN-32 – ebenfalls Flagelline glykosylieren.

3.2 Ein duales Flagellensystem in *Shewanella putrefaciens* CN-32

Flagellen sind hocheffiziente Systeme, die Bakterien nutzen, um sich von widrigen Bedingungen weg, oder auf favorisierte Habitate zu, zu bewegen. Die Flagelle wurde darüber hinaus aber auch mit einer sensorischen Funktion in Verbindung gebracht. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium kann mittels der Flagellen beispielsweise die Umgebungsfeuchtigkeit wahrnehmen, was im Zusammenhang mit der Sekretionseffizienz von FlgM (anti-Sigmafaktor σ^{28}) steht [385]. *Vibrio parahaemolyticus* kann die Viskosität der Umwelt wahrnehmen, indem die polare Flagelle als Mechanosensor fungiert und somit die Rotationsgeschwindigkeit der Flagelle misst [145]. Manche pathogene Organismen adhären mittels der Flagellen an die Epithelzellen eines Wirts, wodurch die Flagelle nicht zuletzt aus diesem Grund als ein wichtiger Virulenzfaktor gilt. Auch die Erkundung neuer Habitate und die Bildung sessiler Lebensgemeinschaften beruhen auf der Funktionalität der Flagellen. Diese Vielfalt an Aufgaben macht Flagellen zu einem essentiellen Bestandteil der Überlebensstrategie der meisten Bakterien. Während viele Organismen ein einzelnes

Flagellensystem besitzen, findet man in immer mehr Organismen zwei funktionelle Flagellensysteme – ein polares Flagellensystem neben einem sekundären, lateralen Flagellensystem. *Vibrio parahaemolyticus* und *Aeromonas hydrophila* gelten im Bezug auf die dualen Flagellensysteme als die bestuntersuchten Organismen [92, 225, 231, 342, 393, 394], jedoch konnten auch in verschiedenen Spezies von *Azospirillum* und *Rhodospirillum*, sowie in *Bradyrhizobium japonicum*, *Photobacterium profundum* und *Rhodobacter sphaeroides* funktionelle sekundäre Flagellensysteme gefunden werden [6, 144, 227, 238, 276, 285, 307, 350]. Interessanterweise wurden sekundäre Flagellensysteme, die den lateralen Flagellensystemen von *Vibrio*, bzw. *Aeromonas* ähneln, auch in Organismen identifiziert, die nicht polar, sondern peritrich flagelliert sind, wie zum Beispiel in *E. coli* 042, *Citrobacter rodentium*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Chromobacterium violaceum* [288]. Aufgrund der Präsenz eines dualen Flagellensystems in etwa einem Fünftel aller sequenzierten *E. coli* Stämme und in nah verwandten Stämmen wie *C. rodentium*, liegt die Vermutung nahe, dass ein sekundäres Flagellensystem vermutlich von einem frühen Vorfahren akquiriert wurde und nachfolgend in vielen Stämmen wieder verloren gegangen ist. Allerdings geschah der Transfer auf Vorfahren von *E. coli* und *C. rodentium* unabhängig, nachdem sich *E. coli* und *S. enterica* auseinander entwickelten, da *S. enterica* vermutlich nie ein sekundäres Flagellensystem besaß [288].

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass auch in *S. putrefaciens* CN-32 ein duales Flagellensystem existiert, das stark an die dualen Flagellensysteme anderer γ -Proteobakterien, wie *V. parahaemolyticus* oder *A. hydrophila*, erinnert. Allerdings – anders als in *Vibrio* oder *Aeromonas*, die jeweils mehrere Gencluster besitzen, die für ein Flagellensystem codieren [48, 155, 224, 231, 342] – sind die Gene beider Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 jeweils in einer distinkten, zusammenhängenden Genregion zusammengefasst, was auch für das duale Flagellensystem von *S. piezotolerans* WP3 zutrifft [383]. Außerhalb der beiden Regionen sind lediglich die Stator-codierenden Gene und die Gene der Hilfsproteine des polaren Flagellensystems zu finden. Das polare Flagellensystem bildet eine einzelne, jeweils am alten Zellpol lokalisierende Flagelle. Die Rotation dieser Flagelle ist von den spezifischen Na^+ -Ionen-getriebenen Statoren PomA und PomB abhängig, sowie von den spezifisch mit der polaren Flagelle interagierenden Helferproteinen MotX und MotY. In *V. parahaemolyticus* existiert ein MotY-Protein, welches spezifisch mit der lateralen, H^+ -getriebenen Flagelle interagiert und für deren Rotation essentiell ist [342]. Ein solches Protein konnte zwar in *S. putrefaciens* CN-32 im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden, allerdings scheint es, dass Helferproteine wie MotY auch in H^+ -Ionen-getriebenen Flagellensystemen existieren können [73, 342]. Das laterale Flagellensystem bildet in einer Subpopulation von Zellen ein bis zwei zufällig lokalisierende laterale Flagellen aus, die für die Rotation strikt von dem H^+ -Ionen-getriebenen MotAB-Stator-Komplex abhängen. Die Ähnlichkeit der Flagellensysteme der *Shewanella* spp. und Vertretern der *Vibrio* spp., bzw. *Aeromonas* spp. mit dualen Flagellensystemen lässt auf den gleichen Ursprung der lateralen Flagellensysteme schließen.

3.2.1 Ursprung eines dualen Flagellensystems in *Shewanella* spp.

Ein Urahn der heutigen *Shewanella* Spezies besaß, neben dem primären Flagellensystem, wahrscheinlich bereits ein sekundäres, laterales Flagellensystem, das nach der Auffächerung in den meisten Arten verloren ging (vgl. Abb. 8). Für viele der in marinen Habitaten lebenden *Shewanella*

Spezies war vermutlich die Präsenz einer einzelnen polaren Flagelle ausreichend, um das Überleben zu sichern. Nichtsdestotrotz existieren einige Vertreter dieser Spezies, die auch ein laterales Flagellensystem besitzen, wie z.B. *S. baltica* OS155 oder *S. piezotolerans* WP3 [383]. Das polare Flagellensystem ist vermutlich früh entstanden und ist in einer ähnlichen Form ebenfalls in anderen γ -Proteobakterien wie *Pseudoalteromonas* spp., *Glaciecola* spp., *Vibrio* spp., *Photobacterium* spp. und *Aeromonas* spp. zu finden. Das laterale Flagellensystem in den entsprechenden *Shewanella* spp. existierte vermutlich schon vor der Auffächerung in verschiedene Spezies der *Shewanellaceae*. Einerseits spricht dafür die sporadische Verteilung eines sekundären Flagellensystems über den gesamten phylogenetischen Stammbaum: so existieren erstaunlicherweise laterale Flagellensysteme in manchen Stämmen von *S. baltica* (OS155 oder OS183), während in sehr nah verwandten Stämmen ein laterales Flagellensystem fehlt (OS185, OS195 und OS223). Andererseits existieren homologe Systeme ebenfalls in den nahverwandten Spezies von *Vibrio*, *Photobacterium* und *Aeromonas*. Eine Proteinsequenzsuche in den Datenbanken (mittels Protein-BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, unter Ausschluss von *Shewanella*-Vertretern) ergab, dass die Proteinsequenz des jeweiligen MS-Ringproteins FliF₁, bzw. FliF₂ von *S. putrefaciens* CN-32 den höchsten Grad der Identität jedoch mit dem jeweils entsprechenden Protein aus *Ferrimonas balearica* DSM 9799 teilt (FliF₁ zu Fba_2325 = 52 % Identität / 72 % Ähnlichkeit; FliF₂ zu Fba_1035 60 % Identität / 79 % Ähnlichkeit). Dieses dissimilatorisch Eisen-reduzierende Bakterium, als Vertreter der *Ferrimonadaceae*, scheint phylogenetisch der nächste Verwandte des Genus *Shewanella* zu sein [128]. FliF₁ und FliF₂ sind untereinander nur zu 31 % sequenzidentisch und die durchschnittliche Identität der Proteine des polaren, verglichen mit dem lateralen Flagellensystem, mit etwa 39 % nicht sonderlich hoch (vgl. Tabelle 16). Aus dieser Erkenntnis schließe ich, dass ein frühes γ -Proteobakterium vermutlich bereits ein duales Flagellensystem besaß und dieses in einigen später entstandenen Arten verloren ging. Bioinformatische Analysen wiesen bereits darauf hin, dass das sekundäre Flagellensystem in γ -Proteobakterien durch eine Duplikation des primären Flagellensystems in einem nicht-enterischen Vorfahren der γ -Proteobakterien entstanden ist und nachfolgend unabhängig von einander auf ursprüngliche, enterische γ -Proteobakterien und β -Proteobakterien durch horizontalen Gentransfer übertragen wurde [194]. Auch in diesen Phylen der Bakterien wurden sekundäre Flagellensysteme nur vereinzelt beibehalten, was durch die Präsenz eines sekundären Flagellensystems in manchen *E. coli* Subspezies belegt wird [288].

3.2.2 Die Spezifität und Regulation eines dualen synchron funktionierenden Flagellensystems

Die hier durchgeführten Versuche bezüglich des dualen Flagellensystems von *S. putrefaciens* CN-32 zeigten, dass das polare und das laterale Flagellensystem auf struktureller Ebene hochspezifisch sind, jedoch eine regulatorische Interaktion beider Flagellensysteme besteht. Ich konnte zeigen, dass ein konstitutiv produziertes polares Flagellensystem in *S. putrefaciens* CN-32 existiert. Zusätzlich dazu, wenn sich komplexe Medienbestandteile – also Aminosäuren und kurzkettige Peptide – im Medium befanden, wurde in einer kleineren Subpopulation an Zellen zusätzlich eine geringe Anzahl an zufällig lokalisierenden, lateralen Flagellen produziert. In Organismen mit dualen Flagellensystemen, wie *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila* oder *R. centenum*,

werden die sekundären Flagellensysteme ausschließlich unter Bedingungen produziert, welche die Funktion der polaren Flagelle einschränken, wie beispielsweise das Wachstum auf festen Oberflächen oder in viskoser Umgebung, was dazu führt, dass sich die Zellen zu extrem verlängerten (5 – 20-fache Länge der Schwimmerzellen) sogenannten Schwärmer-Zellen differenzieren, die eine große Anzahl an lateralen Flagellen produzieren [221, 285, 371]. In *V. parahaemolyticus* wird, neben den Signalen, welche die Funktion der polaren Flagelle beeinträchtigen, als ein weiteres Signal noch Eisenlimitierung benötigt, um die Differenzierung zu Schwärmer-Zellen einzuleiten [220]. Daher scheint das sekundäre Flagellensystem in *V. parahaemolyticus* nur unter Bedingungen produziert zu werden, in denen dieser Organismus nicht gut wachsen oder sich nicht bzw. nur schlecht mit der polaren Flagelle fortbewegen kann [92]. Auch im atypischen dualen Flagellensystem des α -Proteobakteriums *B. japonicum* wird das sekundäre Flagellensystem durch erhöhte Viskosität induziert [144]. In *S. putrefaciens* CN-32 hatte das Wachstum auf einer Oberfläche ebenfalls einen induzierenden Effekt auf die Transkription der Gene des lateralen Flagellensystems. Allerdings, wie bereits erwähnt, führte das exponentielle Wachstum in flüssigem Komplexmedium auch zu einer Induktion der Gene des lateralen Flagellensystems, ohne jedoch die Transkription der Gene für die polare Flagelle zu beeinträchtigen. Das bedeutet, dass unter den genannten Umständen zwei strukturhomologe Proteinkomplexe gleichzeitig produziert werden und funktionell co-existieren.

Der durchschnittliche Grad der Sequenzidentität zwischen beiden Flagellensystemen ist, wie oben bereits genannt, mit 39 % eher gering, obwohl die einzelnen Proteine des Flagellensystems sehr ähnliche Funktionen in dieser komplexen Nano-Maschine übernehmen. Ich konnte zeigen, dass die Motorkomponenten FliM₁ und FliM₂ hochspezifisch für ihr entsprechendes Flagellensystem sind. Dasselbe trifft auch für die Statorkomplexe PomAB, welches strikt mit dem polaren Flagellensystem interagiert und MotAB zu, welches strikt mit dem lateralen Flagellensystem zusammenarbeitet. MotX und MotY interagieren ihrerseits mit dem PomAB-Stator und sind aus diesem Grund speziell für die Funktion der polaren Flagelle entscheidend [222, 223, 258, 259]. Gerade im Hinblick auf sehr dynamische Komponenten der Flagellensysteme, wie FliM oder die Statorkomponenten [64, 86, 180], die kontinuierlich und ohne die Funktion der Flagelle zu beeinträchtigen, ausgetauscht werden, ist dies eine interessante Erkenntnis. Auch die Statorkomplexe selbst können in ihrer Funktion sehr dynamisch sein, da bereits in mehreren Organismen, wie beispielsweise *A. hydrophila*, *Bacillus subtilis* und *P. aeruginosa*, jeweils zwei Statorsysteme entdeckt werden konnten, die mit einem Flagellensystem interagieren und die Funktion der Flagellen unter verschiedenen Bedingungen verbessern [73, 126, 127, 231, 321, 365, 366, 395]. In *S. oneidensis* MR-1 existieren ebenfalls zwei Statorsysteme, PomAB und MotAB, die mit der polaren Flagelle interagieren können [270]. Der Na⁺-Ionen-getriebene Stator PomAB ist der dominante Stator, der aber bei Verlust durch den H⁺-Ionen-getriebenen Stator MotAB ersetzt werden kann, auch wenn dadurch die Funktion der Flagelle eingeschränkt wird [270]. Darüber hinaus konnten bereits mehrere Versuche zeigen, dass *S. oneidensis* MR-1 einen Hybridmotor besitzt, der sich in Abhängigkeit der Natrium-Konzentration im Medium aus PomAB- und MotAB-Statorelementen zusammensetzt [269]. Obwohl diese Art des „bakteriellen Motortunings“ eine weit verbreitete Anpassung der Motilität zu sein scheint [358], weisen meine Daten darauf hin, dass die getesteten Komponenten der Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 hochspezifisch und nicht dynamisch untereinander austauschbar sind.

Die Notwendigkeit zweier hochspezifischer Systeme in *S. putrefaciens* CN-32 liegt vermutlich in der Funktionalität der Flagellensysteme begründet. Ein Austausch von Motorkomponenten zwischen zwei Flagellensystemen, wie er beispielsweise in *Vibrio shilonii* beobachtet wurde [96], könnte die Funktion des Systems beeinträchtigen, wenn homologe Komponenten von beiden Flagellensystemen geteilt würden, wie auch das Beispiel der Statoren von *S. oneidensis* MR-1 zeigt. Wahrscheinlich nicht zuletzt aus diesem Grund sind die Komponenten der nah verwandten dualen Flagellensysteme von *V. parahaemolyticus* und *A. hydrophila* ebenso spezifisch, wie in *S. putrefaciens* CN-32 beobachtet [225, 226, 231, 395]. Die Notwendigkeit der Spezifität könnte sich jedoch eher auf die strukturellen Komponenten der Flagellensysteme beziehen. Die bioinformatische Analyse zeigte die durchschnittliche Sequenzidentität aller Proteinhomologe, die sowohl im polaren, wie auch im lateralen Flagellensystem vorkommen. Wenn man jedoch die durchschnittliche Sequenzidentität der Strukturproteine untereinander mit der von Proteinen vergleicht, deren Aktivität sich auf die Exportmaschinerie oder die Regulation der Flagelle bezieht, ergibt sich für erstere eine durchschnittliche Sequenzidentität von etwa 34 %, während die Zweitgenannten durchschnittlich zu etwa 44 % sequenzidentisch sind. Entsprechend kann in *V. parahaemolyticus* der Regulator des lateralen Flagellensystems LafK (homolog zu FlrA₂) den Verlust des Hauptregulators der polaren Flagelle, FlaK (homolog zu FlrA₁), kompensieren [156]. Demnach scheint sich die Dynamik und Diversität der Flagellensysteme eher auf die regulatorische und – vor allem im Bezug auf synchron arbeitende homologe Proteinkomplexe – weniger auf die strukturelle Ebene zu beziehen. Somit haben sich duale Flagellensysteme in den meisten γ -Proteobakterien vermutlich zu strukturell distinkten Systemen ausgebildet, während die Regulationsmechanismen der Flagellensysteme sehr divers sein können. Intensive Genom- und Transkriptom-Studien konnten zeigen, dass sich Regulatoren und regulatorische Netzwerke in Bakterien evolutionär wesentlich schneller entwickeln als die zu regulierenden Gene [207, 210]. Dementsprechend und trotz der offenkundigen Ähnlichkeit der dualen Flagellensysteme der nicht-enterischen γ -Proteobakterien, sind Regulationsmechanismen entstanden, die sich untereinander stark unterscheiden, jedoch den entsprechenden Habitaten und Umweltbedingungen angepasst sind [225, 231, 383]. Zukünftige Studien müssten jedoch zeigen, ob Proteine der Exportmaschinerie mit einem höheren Grad der Sequenzidentität, wie zum Beispiel FliI_{1/2} (60 %) oder FliP_{1/2} (56 %) mit beiden Flagellensystemen interagieren können und eventuell den Verlust des entsprechenden Orthologs kompensieren können.

Meine Studien zeigten des Weiteren, dass sowohl das polare wie auch das laterale Flagellensystem von der Präsenz des jeweils anderen profitiert, da die Transkription von *flhF*₁, wie auch *flhF*₂ durch das Fehlen des anderen Flagellensystems negativ beeinflusst wurde. Auch wenn erste Hinweise darauf hindeuten, dass der Hauptregulator des polaren Flagellensystems FlrA₁ die Transkription von Genen des lateralen Flagellensystems induzieren kann (Stefanie Gasch, unveröffentlicht), sind die grundlegenden regulatorischen Mechanismen nicht bekannt. Dennoch kann aus der positiven gegenseitigen Beeinflussung der Regulation geschlossen werden, dass eine funktionelle Interaktion der Flagellensysteme wahrscheinlich ist, auch wenn einzelne Proteine nicht mit dem anderen Flagellensystem interagieren.

3.2.3 Die Rolle der Heterogenität in der Population von *S. putrefaciens* CN-32

Die genotypische Ausstattung von Bakterien ist ein maßgeblicher Faktor für deren Überlebensstrategie. Der Genotyp ermöglicht es den Organismen ein bestimmtes Repertoire an Mechanismen zu nutzen, um das Überleben zu sichern. Allerdings besteht ein entscheidender Unterschied zwischen der genetischen Ausstattung und der tatsächlichen Expression der Gene. Schon sehr früh wurde eine sogenannte Bistabilität¹⁴ bei der Laktose-Verwertung in *E. coli*-Kulturen entdeckt, die sich dergestalt auswirkt, dass lediglich eine Subpopulation die notwendigen Gene zur Laktose-Verwertung exprimiert, während in der anderen Subpopulation die entsprechenden Gene nicht transkribiert werden [254]. In *B. subtilis*-Populationen besteht ebenfalls eine Bistabilität in Bezug auf die natürliche Kompetenz dieses Organismus [46, 105]. Auch bakterielle Chemotaxis unterliegt der Variabilität der Genexpression [338], die durch die Entkoppelung von der natürlichen Regulationskaskade minimiert werden kann [169]. Diese epigenetische Variation und die daraus folgende, phänotypische Heterogenität können unter bestimmten Umständen die Überlebensrate und die Fitness einer Population erhöhen [355]. Die Ursachen der Heterogenität der Systeme sind in den einzelnen Fällen nicht immer bekannt, jedoch zählen zu den möglichen Faktoren meistens das stochastische Hintergrundrauschen (engl.: *noise*) der Genexpression, also eine gewisse Variabilität der Transkription von Genen, der Zellzyklus, die Zellalterung oder epigenetische Regulation [18].

Die Produktion und Funktionalität beider Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 ist notwendig, um ein effizientes Schwimmverhalten zu erreichen. Allerdings zeigten die Experimente auch, dass nur eine Subpopulation von etwa 40 % der Gesamtpopulation sowohl das primäre, wie auch das sekundäre Flagellensystem produziert, wenn die Kultur in exponentieller Phase in flüssigem Komplexmedium wächst (vgl. Abb. 15). Das bedeutet also, dass unter diesen Bedingungen der größere Teil der Population nur die polare Flagelle produziert oder kein Filament aufweist. Diese prozentuale Verteilung ändert sich jedoch, wenn man die Populationszusammensetzung der Kulturen in Schwimmagarplatten über die jeweilige Entfernung der Population zum Mittelpunkt betrachtet (vgl. Abb. 19). Am äußeren Rand des Schwimmradius produzieren nahezu alle Zellen auch das sekundäre Flagellensystem und besitzen dementsprechend ebenfalls laterale Filamente. Anders die Zellen in der Mitte der Population, in der in mindestens 50 % der Zellen eine polare Flagelle auszureichen scheint. Es findet hier nun offensichtlich eine Veränderung bezüglich der Heterogenität der Population statt. Diese Veränderung könnte sich aus zwei Ursachen begründen. Einerseits könnte diese Beobachtung einem sekundären Effekt zugrunde liegen und daraus entstehen, dass nur Zellen mit beiden Flagellensystemen effektiv genug vorankommen und daher nahezu die gesamte Population am äußeren Rand des Schwimmradius ausmachen. Andererseits könnte ein primärer, mutmaßlich regulatorischer Effekt diese Veränderung der Heterogenität hervorrufen. Gegen ersteres spricht, dass der prozentuale Anteil der Zellen im Inneren des Schwimmradius (etwa 50 %), die das sekundäre Flagellensystem produzieren, identisch ist mit einer Population in flüssigem Medium. Wäre dagegen die Heterogenität der Population der strikten Bistabilität der Genexpression geschuldet, müsste die Zahl der Zellen mit

¹⁴ Bistabilität beschreibt das Phänomen, dass zwei stabile Modi der Genexpression in einer, auf genetischer Ebene homogenen, Population co-existieren.

lateralen Flagellen im inneren und mittleren Bereich des Schwimmradius geringer sein, als in planktonischer Kultur. Der Populationsanteil, der beide Flagellensysteme produzierte, würde sich dann vom Äußeren zum Inneren des Schwimmradius „ausdünnen“, da diese Zellen effektiver durch den Schwimmgang navigieren können. Da aber die Population, die laterale Flagellen produziert, im inneren Bereich des Schwimmradius nicht kleiner wird, postuliere ich, dass eine Subpopulation aktiv das kostenintensive, sekundäre Flagellensystem zum Wohl der gesamten Population produziert indem, als Reaktion auf entstehende Nährstoffgradienten in diesem strukturierten Habitat [52], ein epigenetischer Schalter die Co-Produktion von polarem und lateralem Flagellensystem stimuliert. Unklar ist jedoch die Beschaffenheit eines solchen Schalters oder einer zugrundeliegenden Regulationskaskade. Wahrscheinlich sind die Regulationselemente des polaren Flagellensystems, wie der Hauptregulator FlrA₁, das Flagellen-spezifische Zweikomponentensystem FlrBC₁ (homolog zu FlaLM in *V. parahaemolyticus*), oder FliA₁ intensiv an der Koordination dieser epigenetischen Antwort beteiligt. Dafür spricht nicht zuletzt die enge regulatorische Interaktion des polaren und lateralen Flagellensystems. Außerdem lässt die koordinierte Co-Produktion der Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 zusätzlich auf eine enge funktionelle Interaktion der polaren mit den lateralen Flagellen schließen. Das Chemotaxissystem kommt dabei als zusätzliche molekulare Koordinations-Maschinerie der Flagellensysteme in Frage.

3.2.4 Wirkung und Funktion eines spezifischen Chemotaxissystems in

S. putrefaciens CN-32

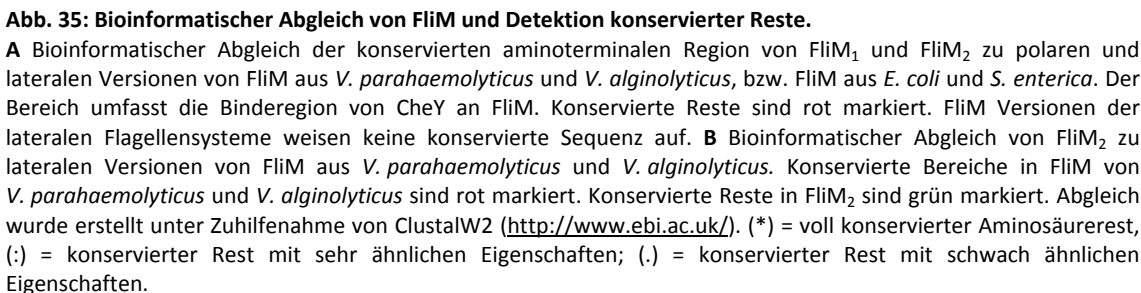
Nahezu 70 % aller isolierten und sequenzierten Bakterien sind motil. Die Motilität scheint demnach ein archaisches Merkmal der meisten Bakterien zu sein und hat sich entwicklungsgeschichtlich vermutlich sehr früh etabliert [386]. Motilität hat sich in beinahe allen Habitaten durchgesetzt, die den Unterhalt einer Bewegungsmaschinerie zuließen, also eine ausreichend hohe Nährstoffkonzentration aufwiesen, was motilen Organismen – aufgrund entstehender Nährstoffgradienten – immer einen Vorteil gegenüber der passiven Bewegung nicht-motiler Zellen gewährte [386]. Chemotaxis beschreibt die gerichtete Bewegung von Mikroorganismen hin zu günstigen und weg von ungünstigen Habitaten, wodurch ein signifikanter Anstieg der Fitness für die Population entsteht [11]. Sie dient damit der Modulierung der Motilität und verschafft den Organismen bei der Reaktion auf spezifische Reize in den jeweiligen Habitaten einen Besiedlungsvorteil. Diese Reaktion wird durch die Interaktion mit der Bewegungsmaschinerie erreicht, was zu einer effektiveren Steuerung der Flagellen führt.

Intensive Forschungsarbeit wurde zunächst in die Untersuchung der Chemotaxis in Organismen mit einem Flagellensystem investiert. Die peritrich flagellierten Bakterien *E. coli* und *S. enterica* serovar Typhimurium dienten dabei als Modellorganismen, um grundlegende Mechanismen und Zusammenhänge in diesen relativ einfach aufgebauten Chemotaxiskaskaden zu analysieren (für Übersichtsartikel siehe [111, 112, 149, 333, 334, 336, 382]). Neben diesem einfach aufgebauten Chemotaxissystem gibt es einige Bakterien, wie *R. sphaeroides* oder *P. aeruginosa*, deren chemosensorische Mechanismen wesentlich komplexer sind [278].

Weit weniger ist über die Chemotaxis in Bakterien mit dualen Flagellensystemen bekannt. *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus*, deren distinkte duale Flagellensysteme große Ähnlichkeit mit denen der *Shewanella* spp. aufweisen, besitzen – wie auch *S. putrefaciens* CN-32 – jeweils ein einzelnes Chemotaxissystem. *V. parahaemolyticus* produziert eine polare Flagelle, um in flüssigen Medien zu schwimmen und kann zusätzlich, nach einer zellmorphologischen Differenzierung zu Schwärmerzellen, viele laterale Flagellen produzieren, um über Oberflächen zu schwärmen [225]. Interessanterweise werden dabei beide Flagellensysteme unter den jeweiligen Umständen durch das Chemotaxissystem reguliert [300], was eine spezifische Interaktion von einem CheY-Protein mit zwei verschiedenen FliM-, bzw. FliN-Proteinen erfordert. In *V. alginolyticus* interagiert CheY ebenfalls mit beiden Flagellensystemen und induziert den CCW- zu CW-Richtungswechsel der polaren Flagelle, während die Drehgeschwindigkeit der unidirektional CCW-drehenden lateralen Flagelle durch eine erhöhte CheY-Konzentration verlangsamt wird [164]. In diesen *Vibrio* spp. scheint sich demnach ein Chemotaxissystem entwickelt zu haben, das zwei verschiedene – aber unter unterschiedlichen Bedingungen funktionierende – Flagellensysteme regulieren kann. Somit hat CheY in diesen Spezies sowohl Einfluss auf effektives Schwimmen in flüssiger Kultur, aber auch auf das Schwärmen über Oberflächen [164, 300].

Im Gegensatz dazu lassen sowohl die hier durchgeführten genetischen und phänotypischen Untersuchungen, wie auch die fluoreszenzmikroskopischen Analysen des Chemotaxissystems von *S. putrefaciens* CN-32 vermuten, dass in diesem Organismus ein einzelnes Chemotaxissystem existiert und spezifisch mit dem Basalkörper der polaren Flagelle interagiert und dadurch Drehrichtungsänderungen von CCW zu CW induziert. Worin besteht also der Unterschied in der Wirkungsweise des Chemotaxissystems auf das duale Flagellensystem in *S. putrefaciens* CN-32 und warum? Ein bioinformatischer Abgleich der aminoterminalen Domäne von FliM zeigt die Bindestelle zwischen FliM und CheY und die konservierten Reste [184], die sich sowohl in FliM von *E. coli* und *S. enterica* serovar Typhimurium, als auch in den FliM-Proteinen der polaren Flagellensysteme von *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* und *S. putrefaciens* CN-32 wiederfinden lassen (vgl. Abb. 35A). Diese Reste sind jedoch in den FliM-Proteinen der lateralen Flagellensysteme nicht konserviert, was eine andere Wirkungsweise von CheY vermuten lässt, was die CheY-abhängige Reduktion der Flagellendrehgeschwindigkeit der lateralen Flagellen im Fall von *V. alginolyticus* belegt [164]. Ein bioinformatischer Abgleich der FliM-Sequenzen der lateralen Flagellensysteme zeigt, dass zwar die FliM Proteinsequenzen von *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* hoch konserviert sind, aber nur wenige Bereiche der FliM-Sequenzen beider *Vibrio* spp. auch in FliM₂¹⁵ von *S. putrefaciens* CN-32 konserviert sind (vgl. Abb. 35B). Daher hypothesisiere ich, dass eine funktionelle Co-Evolution oder Konservierung der Interaktion des Chemotaxissystems mit dem dualen Flagellensystem in *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* stattgefunden hat, während im Gegensatz dazu in *S. putrefaciens* CN-32 eine divergente Entwicklung zu der funktionellen Unabhängigkeit des lateralen Flagellensystems von der Chemotaxismaschinerie führte. Dafür spricht auch, dass ein

¹⁵ Identität/Ähnlichkeit von FliM₂ zu lateralem FliM von *V. parahaemolyticus*: 27 %/46 % (E-Wert=1x10⁻⁰⁹(!)); 65 % der Sequenzlänge abgedeckt, carboxyterminaler Bereich. Identität/Ähnlichkeit von FliM₂ zu lateralem FliM von *V. alginolyticus*: 27 %/45 % (E-Wert=1x10⁻⁰⁶(!)); 65 % der Sequenzlänge abgedeckt, carboxyterminaler Bereich.



Während also die Interaktion des Chemotaxisystems mit der polaren Flagelle in *S. putrefaciens* CN-32 auf die gleiche Art und Weise wie in den bereits beschriebenen Organismen zu funktionieren scheint, unterscheidet sich der Mechanismus der lateralen Flagelle nicht zuletzt auf chemosensorischer Ebene signifikant. Da im Gegensatz zu den bisherigen Erkenntnissen über die Funktion der dualen Flagellensysteme in *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus*, sowohl die polare, als auch die laterale Flagelle in *S. putrefaciens* CN-32 für effektives Schwimmverhalten zuständig ist, könnte sich die Divergenz der Flagellensysteme in der bereits erwähnten funktionellen Interaktion beider Flagellensysteme begründen. Diese Interaktion könnte die Steuerung beider Flagellensysteme durch ein Chemotaxisystem überflüssig machen, da aus dem Zusammenspiel der polaren und lateralen Flagelle ein synergistischer Effekt entsteht und somit die Steuerung beider Flagellensysteme durch ein CheY-Signalmolekül von Nachteil wäre. Eine interessante Beobachtung diesbezüglich war auch die synergistische Funktionsweise des dualen Flagellensystems für die radiale Ausbreitung in Schwimmar. Während eine $\Delta/lrAB_1$ -Mutante mit ausschließlich lateralen

93

Flagellen durchschnittlich etwa 14 % des Wildtyp-Schwimmradius erreichte, schwamm eine polarflagellierte $\Delta flaAB_2$ -Mutante mit einer Effizienz von durchschnittlich 74 %. Zusammengenommen kommen die einzelnen Stämme jedoch nur auf 88 % der Schwimmeffizienz verglichen mit den synchron arbeitenden Flagellensystemen des Wildtyps. Wie entsteht also diese nicht besonders große, aber signifikante, Steigerung der effektiven und gerichteten Schwimmbewegung? Zum Beispiel zeigten Zellen, denen das laterale Flagellensystem und zusätzlich (ein funktionales) CheY fehlte, keinerlei Motilität in Schwimmlatten, waren aber in Flüssigkultur motil, wenn auch mit stark reduzierter Richtungswechsel-Frequenz (\emptyset alle 174 s). Auch aus Schwimmlatten isolierte Zellen dieses Stammes waren in flüssigen Medien motil. Dieser vermeintliche Widerspruch zeigt, dass Zellen mit vorwiegend unidirektional drehenden polaren Flagellen vermutlich keine Möglichkeit haben, durch das strukturierte Habitat, den Weichagar, zu navigieren, obwohl einzelne Zellen in flüssigem Medium nicht langsamer schwimmen, als der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Über das Zusammenspiel und die neuartige Funktionsweise dieses dualen Flagellensystems in *S. putrefaciens* CN-32 soll im Folgenden ein Modell vorgestellt werden.

3.2.5 Funktion eines dualen Flagellensystems in *S. putrefaciens* CN-32

Wie bereits erwähnt, scheinen die meisten Vertreter des Genus *Shewanella* das sekundäre Flagellensystem verloren zu haben, da es möglicherweise in den meisten Habitaten nicht von essentieller Bedeutung für die Überlebensstrategie dieser Vertreter der Shewanellen ist, oder geringe Nährstoffkonzentrationen die Aufrechterhaltung des kostspieligen zweiten Flagellensystems nicht zulassen. Gleichwohl zieht der Verlust der polaren Flagelle in *S. putrefaciens* CN-32 einen weitaus schwereren Defekt der Motilität nach sich, als der Verlust des lateralen Flagellensystems.

Nichtsdestotrotz hat eine Reihe von *Shewanella* spp. das sekundäre Flagellensystem aufrechterhalten, auch wenn über deren Funktionalität in den meisten *Shewanella* spp. wenig gesagt werden kann. Von *S. piezotolerans* WP3 ist bekannt, dass dieses Tiefseesediment-Bakterium unter bestimmten Umständen jeweils eines der beiden Flagellensysteme nutzt, um sich fortzubewegen. Während das polare Flagellensystem unter hohem Partialdruck (20MPa) induziert wird, hat eine niedrige Temperatur (4°C) den gegenteiligen Effekt [383]. Das laterale Flagellensystem ist dagegen genau invers reguliert. Das polare Flagellensystem bei *S. piezotolerans* WP3 produziert ein einzelnes polares Flagellenfilament, das laterale Flagellensystem ist – anders als in *S. putrefaciens* CN-32 – durch die Produktion einer Vielzahl lateraler Flagellen gekennzeichnet [383]. Beide Flagellensysteme werden in diesem Organismus – ähnlich wie in *Vibrio* oder *Aeromonas* spp. – unter bestimmten Bedingungen produziert, allerdings lässt ein Habitat im 2.000 m unter der Meeresoberfläche gelegenen Tiefseesediment darauf schließen, dass vermutlich hoher Druck und tiefe Temperaturen gleichzeitig vorherrschen. Somit ist es vorstellbar, dass auch in diesem Organismus beide Flagellensysteme unter nativen Bedingungen synchron produziert werden.

In *S. putrefaciens* CN-32 wird während dem exponentiellen Wachstum in Komplexmedium, zusätzlich zu dem polaren, auch das sekundäre Flagellensystem produziert. Auch das Wachstum auf einer Oberfläche kann die Produktion des sekundären Flagellensystems stark induzieren, wie es bereits in *S. piezotolerans* WP3 und *V. parahaemolyticus* gezeigt wurde [23, 92, 342, 383]. Ein solcher

Oberflächenkontakt führt in *V. parahaemolyticus* und *Azospirillum lipoferum* zu einer Verlangsamung der Flagellendrehung und somit zu einem verringerten Ionenfluss durch die Statoren des polaren Flagellensystems, was als Signal für die Induktion des lateralen Flagellensystems dient [5, 23, 145, 219]. Diese Ionenfluss-Sensorik könnte ein genereller Mechanismus der Oberflächenwahrnehmung sein, da in *S. putrefaciens* CN-32 eine Paralyse der polaren Flagelle (durch Deletion der Statoren, oder durch Zugabe des spezifischen Na^+ -Ionen-Kanal-Hemmstoffs Phenamil) ebenfalls die Transkription von Genen der lateralen Flagelle induzieren konnte, während die Deletion der Flagelline keinen Einfluss auf die Transkription der Gene des lateralen Flagellensystems hatte (Stefanie Gasch, nicht veröffentlichte Daten). Trotz der Induktion der Gene des lateralen Flagellensystems auf Oberflächen, konnte jedoch zu keiner Zeit ein Schwärmen der *S. putrefaciens* CN-32 Population beobachtet werden. Allerdings ist das Zusammenspiel einer Vielzahl von regulatorischen Komponenten und Faktoren, wie die „Surfactant“-Sekretion vonnöten, um das Schwärmen von Bakterien zu ermöglichen, bzw. zu induzieren [147, 266]. Es ist daher möglich, dass die entsprechenden Voraussetzungen für *S. putrefaciens* CN-32 unter den getesteten Bedingungen nicht erfüllt wurden. Allerdings weisen alle durchgeführten Experimente darauf hin, dass sich die effektive Navigation mittels des dualen Flagellensystems bereits in flüssiger Umgebung offenbart und daher für das Schwimmverhalten einzelner Zellen relevant sein könnte.

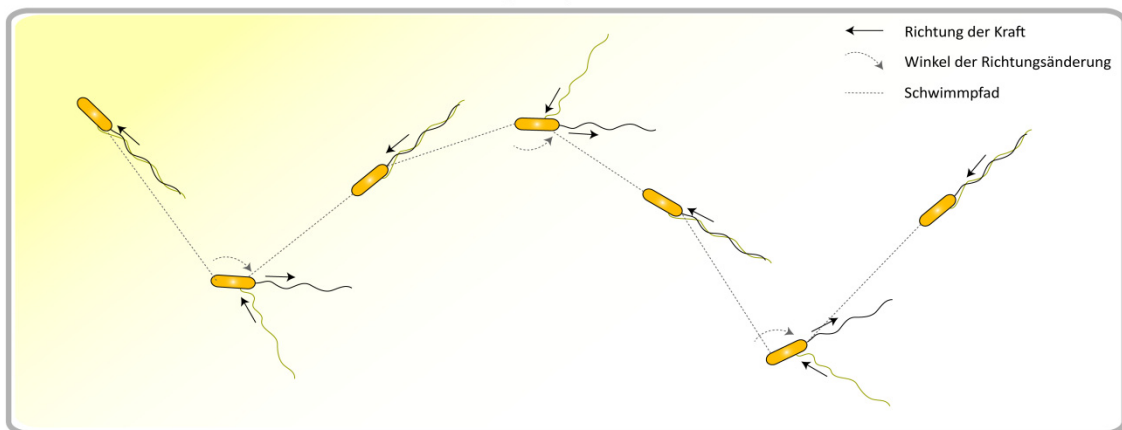
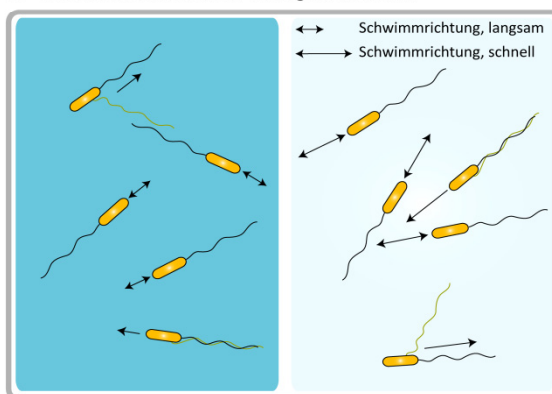
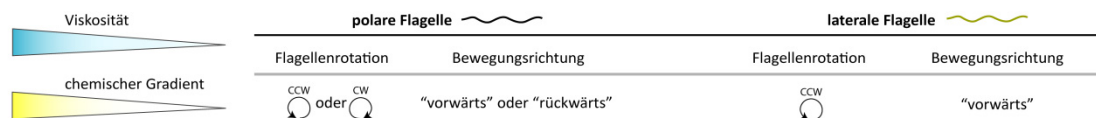
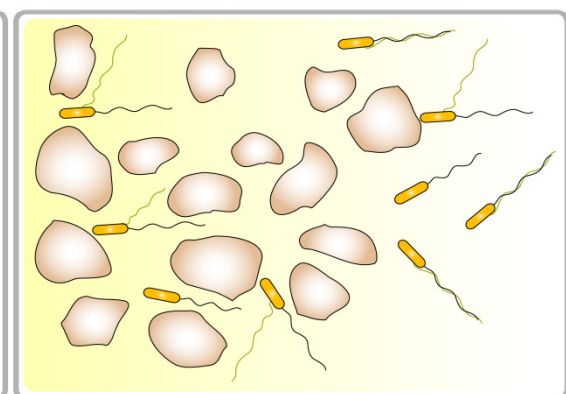
Bakterienzellen sind, aufgrund ihrer sehr geringen Masse und der daraus folgenden niedrigen potentiellen Trägheitskraft, den Regeln des Lebens bei niedrigen Reynolds-Zahlen unterworfen [283]. Das bedeutet, dass Bakterien ohne konstitutive und aktive Bewegung keine räumliche Orientierung möglich wäre. Dieses physikalische Problem umgehen *E. coli*-Zellen durch das Taumeln, um eine Neuorientierung des Zellkörpers zu erreichen. Bakterien mit einer polaren Flagelle entstehen allerdings diesbezüglich gewisse Limitationen, da eine Rotationsänderung der Flagellendrehung die Zelle, dem „Scallop Theorem“¹⁷ folgend, nur an den ursprünglichen Ausgangsort zurückbringen würde [283]. Untersuchungen der Motilität von polar flagellierten Organismen, wie *C. crescentus* und *V. alginolyticus*, zeigten, dass eine Amplifikation der Brown'schen Molekularbewegung in der Nähe von Oberflächen stattfindet, der sogenannte „Wand-Effekt“ [179, 286], was zu einer kreisförmigen Bewegung während des Rückwärts-Schwimmens der Zellen führt [189, 214]. Durch das kreisförmige Rückwärts-Schwimmen wird die Bewegungsrichtung geändert und damit die chemotaktische Effizienz erhöht. Auch *E. coli* zeigt eine erhöhte Chemotaxis, wenn die Untersuchungen in dünnen Glas-Kapillaren durchgeführt werden und die Zellen sich somit ständig in der Nähe einer Oberfläche befinden [26]. Das würde bedeuten, dass effektive Chemotaxis nur in der Nähe von Oberflächen stattfinden könnte [399]. *V. alginolyticus* dagegen verwendet die Flagelle zwischen einem Richtungswechsel von CCW zu CW als eine Art Ruder, um die Limitation des „Scallop Theorem“ zu überwinden, auch wenn sich die Zellen nicht in der Nähe einer Oberfläche befinden [399]. *Pseudomonas fluorescens* SBW25 unterbricht zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Schwimmen die Flagellendrehung, was zu einem „Schwebestand“ führt und dafür sorgt, dass die Brown'sche Molekularbewegung die Neuorientierung der Zelle verstärkt [274]. Obwohl auch das Chemotaxisystem in *S. putrefaciens* CN-32 spezifisch mit der polaren Flagelle interagiert, konnte ich

¹⁷ Das „Scallop Theorem“ besagt, dass für eine effektive Vorwärtspropagation bei niedriger Reynolds-Zahl eine, in der Zeitumkehr nicht-reziproke Bewegung erforderlich ist. Beschrieben in [283].

in den Konkurrenzversuchen¹⁸ der Populationen zeigen, dass sich die Wildtyp-Zellen mit dem dualen Flagellensystem in Weichagar, aber erstaunlicherweise auch in flüssigem Medium, effektiver fortbewegen können, als die $\Delta flaAB_1$ - oder $\Delta flaAB_2$ -Mutante (vgl. Abb. 25, Abb. 26). Es ist dabei wichtig hervorzuheben, dass die radiale Ausbreitung in Weichagar, bzw. die effektive Schwimmbewegung des Wildtyps durch Chemotaxiskammern, demnach nicht auf einer höheren Schwimgeschwindigkeit einzelner Zellen beruht (vgl. Abb. 36B), sondern vermutlich auf der effektiveren Richtungsänderung und damit auf einer besseren Orientierung einzelner Zellen im Raum (vgl. Abb. 36A,C). Daher vermute ich, dass die lateralen Flagellen eine Rolle in der Neuorientierung der Zellkörper übernehmen. Es war allerdings erstaunlich, dass eine Mutante ohne polare Flagelle, trotz sehr eingeschränkter Motilität in Weichagar, nahezu ein Drittel der Gesamtpopulation nach einem Konkurrenzassay in flüssigem Medium ausmachte (vgl. Abb. 26). Da laterale Flagellen des Öfteren nahe der Pole lokalisierten (vgl. Abb. 12), lautet eine mögliche Erklärung, dass Zellen sich mittels einer solchen subpolaren Flagelle relativ effizient fortbewegen konnten, da durch diese subpolare Lokalisation und die dadurch entstehenden nicht-geradlinigen Bewegungsmuster, die Bewegungsrichtung zusätzlich willkürlicher wurde und damit den Zellen der $\Delta flaAB_1$ -Mutante eine relativ effektive Ausbreitung in flüssigem Medium gewährte.

Ich möchte an dieser Stelle nun eine Hypothese für ein neuartiges duales Flagellensystem aufstellen, das für ein gerichtetes Schwimmverhalten in *S. putrefaciens* CN-32 sorgt. Die polare Flagelle interagiert mit dem Chemotaxissystem und ändert dadurch die Rotationsrichtung von CCW zu CW, während die laterale Flagelle ausschließlich CCW rotiert (vgl. Abb. 36). Daher könnte, bei einer Vorwärts-Bewegung die polare Flagelle mit der lateralen Flagelle (oder mehreren lateralen Flagellen) ein Bündel bilden, ähnlich wie in *E. coli*, oder *S. enterica* serovar Typhimurium beobachtet (vgl. Abb. 36A). Ich vermute, dass die laterale Flagelle langsamer rotiert als die polare Flagelle, was – wenn die Hypothese der Bündel-Bildung korrekt ist – dazu führen könnte, dass das gesamte Flagellenbündel ebenfalls etwas langsamer rotiert. Dies würde auch die, im Vergleich zu einer nur polar-flagellierten Mutante, etwas langsamer schwimmenden Wildtyp-Zellen erklären (vgl. Abb. 14). Bei einem Richtungswechsel der Flagellenrotation der polaren Flagelle würde sich das Bündel lösen und die Zelle rückwärts schwimmen. Durch die kontinuierliche Rotation der lateralen Flagelle wirken zwei gegenläufige Kräfte auf die Zelle und können diese dann effektiv und schnell während des Rückwärts-Schwimmens neu orientieren (vgl. Abb. 36A). Bei erneutem Umschalten der Drehrichtung der polaren Flagelle wird das Bündel erneut gebildet und die Zelle kann in neuer Orientierung weiter geradeaus schwimmen. Durch diese Fähigkeit können sich Zellen mit beiden Flagellensystemen deutlich effektiver orientieren, als Zellen, die nur polare Flagellen produzieren. Vorausgesetzt diese Hypothese ist richtig, existiert vermutlich deshalb eine Subpopulation an Zellen, die beide kostspieligen Flagellensysteme zur gleichen Zeit produziert, um sich zum Wohl der Gesamtpopulation effektiv und gerichtet fortbewegen zu können und dadurch die Besiedlung von neuen Habitaten ermöglicht. Ein größeres Nährstoffangebot gewährt dabei vermutlich die Produktion des lateralen Flagellensystems in einer höheren Zahl an Zellen, was vermuten lässt, dass

¹⁸ Kulturen Fluorophor-markierter Wildtyp-Zellen wurden entweder mit komplementär markierten Zellen der $\Delta flaAB_1$ - oder der $\Delta flaAB_2$ -Mutante im 1:1-Verhältnis gemischt. Die anschließenden Assays fanden in Weichagar oder in Chemotaxiskammern statt (vgl. 2.3.3)

A Modell - Schwimmverhalten mit einem dualen Flagellensystem**B Schwimmverhalten in flüssigem Medium****C Schwimmverhalten in strukturiertem Habitat****Abb. 36: Modell eines dualen Flagellensystems in *S. putrefaciens* CN-32.**

A Schematisches Modell des Schwimmverhaltens einer einzelnen Zelle mit einer polaren und einer lateralen Flagelle (Erklärung von rechts nach links, dem Verlauf des Schwimmpfades der Zelle folgend). Die Zelle schwimmt vorwärts, wobei sich ein Bündel aus CCW-drehender polarer und CCW-drehender lateraler Flagelle bildet. Bei der Änderung der Drehrichtung der polaren Flagelle, löst sich das Flagellenbündel. Die CW-drehende polare Flagelle zieht die Zelle rückwärts, die laterale CCW-drehende Flagelle drückt seitwärts. Durch die einwirkenden Kräfte findet eine Neuorientierung der Zelle statt. Ein Umschalten der Flagellendrehrichtung der polaren Flagelle ermöglicht die erneute Bündel-Bildung mit dem lateralen Filament. Durch die Neuorientierung schwimmt die Zelle den Nährstoffgradienten entlang. **B** Schwimmverhalten in flüssigen Medien mit hoher (links) oder niedriger Viskosität (rechts). Zellen mit polaren und lateralen Flagellen haben keinen Vorteil bezüglich der Schwimmgeschwindigkeit einzelner Zellen im Vergleich zu Zellen mit einer polaren Flagelle. **C** Schwimmverhalten von Zellen in einem schematisch dargestellten strukturierten Habitat, wie zum Beispiel in Weichagar oder Porenfluiden. Durch effektivere Neuorientierung der Zellen mittels der polaren und lateralen Flagelle könnten diese sich aus Sackgassen befreien, oder effektiver um Hindernisse navigieren.

Metabolismus und Regulation der Flagellensysteme eng verwoben sind. Diese „Bet-Hedging“¹⁹ Strategie ermöglicht es *S. putrefaciens* CN-32 Kulturen, sich als Population effizient fortzubewegen, da Subpopulationen das sekundäre Flagellensystem zur verbesserten Navigation durch strukturierte

¹⁹ Eine auf die phänotypische Heterogenität basierende Strategie der Risiko-Verteilung, die einer Population einen längerfristigen Überlebensvorteil in sich verändernden Umgebungen bietet [60].

Habitate wie Porenfluide verwenden können, die vermutlich auch im natürlichen Habitat (Grundwasser führender Schiefersandstein, [83]) von *S. putrefaciens* CN-32 vorkommen.

Zusammenfassend konnte ich die Involvierung eines sekundären Flagellensystems zusätzlich zu einem polaren Flagellensystem in effektiveres Schwimmverhalten von *S. putrefaciens* CN-32 dokumentieren. Eine solche Involvierung eines dualen Flagellensystems in effektiveres Schwimmverhalten wurde bisher noch nicht beschrieben. Es stellt ein potentiell neues System zur zielgerichteten Navigation dar, das auch in anderen Bakterien mit dualen Flagellensystemen für eine effektivere Navigation unter bestimmten Umweltbedingungen sorgen könnte. Zukünftige Studien an weiteren Bakterien mit dualen Flagellensystemen könnten Aufschluss über die Relevanz der sekundären Flagellensysteme für die effektive Navigation einzelner Zellen in Habitaten geben, die eine synchrone Produktion beider Flagellensysteme ermöglichen.

3.2.6 Ausblick: Wie wird die Funktionalität dieses Flagellensystems gewährleistet?

Um meine Hypothese der effektiveren Richtungsänderung von dual-flagellierten Zellen quantitativ zu bestimmen, wird ein Stamm benötigt, der konstitutiv laterale Flagellen produziert. Alle bisherigen Versuche, die Synthese der lateralen Flagellen *in-cis* oder *in-trans* zu induzieren, waren nicht erfolgreich. Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung von Zellen, die beide Flagellensysteme produzieren, wäre die Isolation von Zellen am äußeren Rand von Schwimmrädern. Die Quantifizierung der Neuorientierung von Zellen einer Population mit polaren und lateralen Flagellen, im Vergleich zu einer polar-flagellierten Population, ist essentiell, um eine eindeutige Aussage über die Funktion der lateralen Flagelle zu treffen. Die hypothetische Bündelbildung der CCW-drehenden polaren und lateralen Flagellen könnte durch die *in vivo* Visualisierung der Flagellenfilamente erreicht werden. Direkte Visualisierung mittels Proteinfärbung konnte keine Flagellenfilamente sichtbar machen, was möglicherweise auf die Maskierung des Proteinfilaments durch die Glykosyl-Reste der modifizierten Flagelline zurückzuführen ist. Eine vielversprechende Möglichkeit wäre allerdings die Detektion des Flagellenfilaments mittels Fluorophor-gekoppeltem Maleimid, wie zuletzt eindrucksvoll für *E. coli* und *B. subtilis* gezeigt wurde [104, 370]. Für eine Detektion wäre eine Substitution von Serin oder Threonin zu Cystein notwendig. In FlaA₁ und FlaB₁ könnten dafür das Threonin an Position 159 und das Serin an Position 161 in Frage kommen, da diese vermutlich Oberflächen-exponiert lokalisieren und wahrscheinlich nicht glykosyliert werden. In FlaA₂ könnten die Threonine an den Positionen 159 bis 161 für eine Substitution in Frage kommen. In FlaB₂ könnte die Substitution der Threonine an Position 159 oder 169 zu Cystein eine Maleimid-Detektion ermöglichen.

Zudem ist es interessant zu analysieren, welche Faktoren die Produktion der lateralen Flagellen determinieren und ob die Lokalisation der lateralen Flagellen zufällig ist oder kontrolliert wird. In dem peritrich flagellierten *B. subtilis* wird die Flagellenzahl über das Regulatorprotein SwrA reguliert, der eine schnelle Produktion von etwa 26 Basalkörpern pro Zelle ermöglicht [104]. Ich konnte für *S. putrefaciens* CN-32 eine höhere durchschnittliche Anzahl von lateralen Basalkörpern detektieren, als Filamente pro Zelle vorhanden sind, ähnlich wie es zuvor bereits in *E. coli* beobachtet wurde [64]. Es wäre interessant die Funktion der Basalkörper ohne Flagellenfilament zu analysieren und mögliche Regulatoren der Exportmaschinerie zu enttarnen, die den Export der

Flagelline regulieren. Es wäre vorstellbar, dass ein Pool von Basalkörpern eine schnelle Reaktion auf den Verlust von anderen Flagellenfilamenten gewährleistet oder gewisse Bedingungen eine größere Anzahl lateraler Flagellen nötig machen. Die Regulation der Position der Basalkörper in *B. subtilis* geschieht über ein FlhF-Homolog, das für eine gezielte, symmetrische Lokalisation der Flagellen sorgt [104]. FlhF interagiert in *S. putrefaciens* CN-32 vermutlich nur mit dem polaren Flagellensystem, allerdings könnten genetische Analysen und statistische Auswertungen des Wildtyps im Vergleich zu definierten Mutanten, Aufschluss über mögliche Determinanten der Flagellenlokalisierung und der Regulation des lateralen Flagellensystems geben.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Materialien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Bioline (Luckenwald), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Difco (Heidelberg) geordert.

4.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 7, die verwendeten und konstruierten Plasmide in Tabelle 8 aufgeführt. Alle Stämme wurden als Gefrierkulturen mit 10 % (v/v) DMSO bei -80°C gelagert.

Tabelle 7: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α λpir	<i>recA1 gyrA (lacZYA-argF) (80d lac [lacZ] M15) pir</i> RK6	[232]
WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> ΔM15 RP4-1360 Δ(<i>araBAD</i>) 567Δ <i>dapA</i> 1341::[<i>erm pir</i> (wt)]	W. Metcalf, University of Illinois, Urbana- Champaign
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1		
S79	Wildtyp	[377]
Δ <i>flag</i>	ΔSO_3236 – SO_3238	Paulick, unveröffentlicht
Δ <i>flaA</i>	ΔSO_3238	[71]
Δ <i>flaB</i>	ΔSO_3237	[71]
Δ <i>sfmA</i>	ΔSO_3261	[71]
Δ <i>sfmB</i>	ΔSO_3262	[71]
Δ <i>sfmC</i>	ΔSO_3263	[71]
Δ <i>sfmD</i>	ΔSO_3264	[71]
Δ <i>sfmE</i>	ΔSO_3265	[71]
<i>flaB</i> ^{S105A}	Insertion von <i>flaB</i> in Δ <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 105	Diese Arbeit
<i>flaB</i> ^{S143A}	Insertion von <i>flaB</i> in Δ <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 143	Diese Arbeit
<i>flaB</i> ^{S171A}	Insertion von <i>flaB</i> in Δ <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 171	Diese Arbeit
<i>flaB</i> ^{S180A}	Insertion von <i>flaB</i> in Δ <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 180	Diese Arbeit
<i>flaB</i> ^{S185A}	Insertion von <i>flaB</i> in Δ <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 185	Diese Arbeit
Δ <i>pilMNOPQ</i> Δ <i>mshA</i>	Deletion des MSHA Pilus (ΔSO_4105) im Hintergrund der Deletion des Typ IV Pilus (ΔSO_0281-5)	Julia Gödeke, unveröffentlicht
<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32		
S271	Wildtyp	[83]
<i>flif₂::luxCDABE</i>	Insertion von pNPTS-R6KT-Flif-lateral-RBS-Lux über einfache homologe Rekombination in das Genom; Stamm zur Messung	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>fliF₁::luxCDABE</i>	transkriptioneller Aktivität	diese Arbeit
$\Delta fliF_1$	pNPTS-R6KT-FliF-polar-RBS-Lux	diese Arbeit
$\Delta fliF_2$	Δ Sputcn32_2576	diese Arbeit
$\Delta fliF_{1/2}$	Δ Sputcn32_3476	diese Arbeit
$\Delta fliF_1$	Δ Sputcn32_2576; Δ Sputcn32_3476	diese Arbeit
<i>fliF₂::luxCDABE</i>	Insertion von pNPTS-R6KT-FliF-lateral-RBS-Lux über einfache homologe Rekombination in das Genom; Stamm zur Messung transkriptioneller Aktivität im genomischen Hintergrund von Δ Sputcn32_2576	diese Arbeit
$\Delta fliF_2$	Insertion von pNPTS-R6KT-FliF-polar-RBS-Lux über einfache homologe Rekombination in das Genom; Stamm zur Messung transkriptioneller Aktivität im genomischen Hintergrund von Δ Sputcn32_3476	diese Arbeit
<i>fliF₁::luxCDABE</i>	Δ Sputcn32_2549 – Δ Sputcn32_2605 (Deletion der kompletten Genregion für das polare Flagellensystem)	diese Arbeit
Δ cluster 1	Δ Sputcn32_3444 – Δ Sputcn32_3486 (Deletion der kompletten Genregion für das laterale Flagellensystem)	diese Arbeit
Δ cluster 2	Insertion von pNPTS-R6KT-FliF-lateral-RBS-Lux über einfache homologe Rekombination in das Genom; Stamm zur Messung transkriptioneller Aktivität im genomischen Hintergrund von Δ cluster 1	diese Arbeit
Δ cluster 1	Insertion von pNPTS-R6KT-FliF-polar-RBS-Lux über einfache homologe Rekombination in das Genom; Stamm zur Messung transkriptioneller Aktivität im genomischen Hintergrund von Δ cluster 2	diese Arbeit
<i>fliM₁-Venus</i>	Sputcn32_2569-6xGly-Venus-His6 (verbessertes Yfp)	diese Arbeit
<i>fliM₁-eCfp</i>	Sputcn32_2569-6xGly-eCfp-His6 (verbessertes Cfp)	diese Arbeit
<i>fliM₁-sfGfp</i>	Sputcn32_2569-6xGly-sfGfp-His6 („superfolder“ Gfp)	diese Arbeit
<i>fliM₁-mCherrySO</i>	Sputcn32_2569-6xGly-mCherrySO-His6 (für <i>Shewanella</i> codonoptimiertes mCherry)	diese Arbeit
<i>fliM₂-Venus</i>	Sputcn32_3479-6xGly-Venus-His6 (verbessertes Yfp)	diese Arbeit
<i>fliM₂-eCfp</i>	Sputcn32_3479-6xGly-eCfp-His6 (verbessertes Cfp)	diese Arbeit
<i>fliM₂-sfGfp</i>	Sputcn32_3479-6xGly-sfGfp-His6 („superfolder“ Gfp)	diese Arbeit
<i>fliM₂-mCherrySO</i>	Sputcn32_3479-6xGly-mCherrySO-His6 (für <i>Shewanella</i> codonoptimiertes mCherry)	diese Arbeit
<i>fliM₂-Venus fliM₁-eCfp</i>	Sputcn32_3479-6xGly-Venus-His6; Sputcn32_2569-6xGly-eCfp-His6	diese Arbeit
<i>fliM₂-sfGfp fliM₁-mCherrySO</i>	Sputcn32_2569-6xGly-sfGfp-His6; Sputcn32_3479-6xGly-mCherrySO-His6	diese Arbeit
$\Delta fliM_1$	Δ Sputcn32_2569	diese Arbeit
$\Delta fliM_2$	Δ Sputcn32_3479	diese Arbeit
$\Delta pomAB$	Δ Sputcn32_1278 – Sputcn32_1279	Susanne Brenzinger, [43]
$\Delta motX$	Δ Sputcn32_0748	Natalie Windel, [43]
$\Delta motY$	Δ Sputcn32_1601	Natalie Windel, [43]
$\Delta pomAB \Delta motX$	Deletion von Sputcn32_0748 im Hintergrund von $\Delta pomAB$	Natalie Windel, [43]
Δ cluster 2 $\Delta motX$	Deletion von Sputcn32_0748 im Hintergrund von Δ cluster 2	Natalie Windel, [43]
$\Delta pomAB \Delta motY$	Deletion von Sputcn32_1601 im Hintergrund von $\Delta pomAB$	Natalie Windel, [43]
Δ cluster 2 $\Delta motY$	Deletion von Sputcn32_1601 im Hintergrund von Δ cluster 2	Natalie Windel, [43]
$\Delta flaAB_1$	Δ Sputcn32_2585 – Sputcn32_2586	diese Arbeit
$\Delta flaAB_2$	Δ Sputcn32_3455 – Sputcn32_3456	diese Arbeit
$\Delta cheY$	Δ Sputcn32_2558	diese Arbeit
$\Delta cheY^{putativ}$	Δ Sputcn32_3324	diese Arbeit
<i>cheY-Venus</i>	Sputcn32_2558-6xGly-Venus-His6	diese Arbeit
<i>cheY-eCfp</i>	Sputcn32_2558-6xGly-eCfp-His6	diese Arbeit
<i>cheY-sfGfp</i>	Sputcn32_2558-6xGly-sfGfp-His6	diese Arbeit
<i>cheY-mCherrySO</i>	Sputcn32_2558-6xGly-mCherrySO-His6	diese Arbeit
<i>cheY</i> GOF	Insertion von <i>cheY</i> mit substituierter Asparaginsäure zu Lysin an Position 12 und Tyrosin zu Tryptophan an Position 106 in $\Delta cheY$; konstitutiv aktive Version von CheY	diese Arbeit
<i>cheY</i> LOF	Insertion von <i>cheY</i> mit substituierter Asparaginsäure zu Asparagin an Position 56 in $\Delta cheY$; inaktive Version von CheY	diese Arbeit
<i>sfGfp-3GGs-cheY</i>	<i>sfGfp</i> -His6-3xGly-Gly-Ser-Sputcn32_2558	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>sfGfp</i> -3GGS- <i>cheY</i> GOF	<i>sfGfp</i> -His6-3xGly-Gly-Ser-Sputcn32_2558_D12K/Y106W	diese Arbeit
<i>sfGfp</i> -3GGS- <i>cheY</i> LOF	<i>sfGfp</i> -His6-3xGly-Gly-Ser-Sputcn32_2558_D56N	diese Arbeit
<i>fliM₁</i> - <i>mCherrySO</i>	Insertion von <i>sfGfp</i> -His6-3xGly-Gly-Ser-Sputcn32_2558 in <i>fliM₁</i> - <i>mCherrySO</i>	diese Arbeit
<i>sfGfp</i> -3GGS- <i>cheY</i>		
<i>fliM₂</i> - <i>mCherrySO</i>	Insertion von <i>sfGfp</i> -His6-3xGly-Gly-Ser-Sputcn32_2558 in <i>fliM₂</i> - <i>mCherrySO</i>	diese Arbeit
<i>sfGfp</i> -3GGS- <i>cheY</i>		
<i>fliM₁</i> - <i>mCherrySO</i>	Insertion von Sputcn32_0796- <i>sfGfp</i> mittels einfach homologer Rekombination in <i>fliM₁</i> - <i>mCherrySO</i>	unveröffentlicht
Sputcn32_0796- <i>sfGfp</i>		
Δ <i>flaAB₁</i> Δ <i>cheY</i>	Deletion von Sputcn32_2558 im Hintergrund von Δ <i>flaAB₁</i>	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₁</i> <i>cheY</i> GOF	Insertion von <i>cheY</i> GOF im Hintergrund von Δ <i>flaAB₁</i>	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₁</i> <i>cheY</i> LOF	Insertion von <i>cheY</i> LOF im Hintergrund von Δ <i>flaAB₁</i>	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₂</i> Δ <i>cheY</i>	Deletion von Sputcn32_2558 im Hintergrund von Δ <i>flaAB₂</i>	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₂</i> <i>cheY</i> GOF	Insertion von <i>cheY</i> GOF im Hintergrund von Δ <i>flaAB₂</i>	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₂</i> <i>cheY</i> LOF	Insertion von <i>cheY</i> LOF im Hintergrund von Δ <i>flaAB₂</i>	diese Arbeit
<i>motP</i> :: <i>sfGfp</i>	Insertion von <i>motP</i> :: <i>sfGfp</i> in die <i>glmS</i> -Region in den Wildtyp-Hintergrund zur konstitutiven Produktion von SfGfp	diese Arbeit
<i>motP</i> :: <i>mCherry</i>	Insertion von <i>motP</i> :: <i>mCherry</i> in die <i>glmS</i> -Region in den Wildtyp-Hintergrund zur konstitutiven Produktion von mCherry	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₁</i> <i>motP</i> :: <i>sfGfp</i>	Insertion von <i>motP</i> :: <i>sfGfp</i> in die <i>glmS</i> -Region im Hintergrund von Δ <i>flaAB₁</i> zur konstitutiven Produktion von SfGfp	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₁</i> <i>motP</i> :: <i>mCherry</i>	Insertion von <i>motP</i> :: <i>mCherry</i> in die <i>glmS</i> -Region im Hintergrund von Δ <i>flaAB₁</i> zur konstitutiven Produktion von mCherry	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₂</i> <i>motP</i> :: <i>sfGfp</i>	Insertion von <i>motP</i> :: <i>sfGfp</i> in die <i>glmS</i> -Region im Hintergrund von Δ <i>flaAB₂</i> zur konstitutiven Produktion von SfGfp	diese Arbeit
Δ <i>flaAB₂</i> <i>motP</i> :: <i>mCherry</i>	Insertion von <i>motP</i> :: <i>mCherry</i> in die <i>glmS</i> -Region im Hintergrund von Δ <i>flaAB₂</i> zur konstitutiven Produktion von mCherry	diese Arbeit

Tabelle 8: Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pNPTS138-R6KT	Austausch des pUC origin von pNPTS138 durch einen γ -origin aus pUC18R6KT-mini-Tn7T, Km ^r	[178]
pXCFC-2	<i>oriT oriV</i> , P _{xyI} , <i>ecfp</i> , Km ^r	[354]
pXVENC-2	<i>oriT oriV</i> , P _{xyI} , <i>ecfp</i> , Km ^r	[354]
pCR2.1-mCherry-SO	monomerisches <i>mCherry</i> (synthetisiert) Codon-optimiert für <i>S. oneidensis</i> MR-1	GeneScript
pET21-sfGfp	schnell faltendes (<i>super folder</i>) <i>gfp</i>	[271]
pBBR1-MC5S	<i>oriT mobRK2</i> , <i>oriR</i> , <i>lacZα</i> , Klonierungsvektor, Gm ^r	[172]
pGEX-4T-1	Überexpressionsvektor, induzierbar mit IPTG, N-terminaler GST-Tag, Ap ^r	GE Healthcare

Konstrukte für „in frame“ Deletionen in *S. oneidensis* MR-1 und *S. putrefaciens* CN-32

pNPTS138-R6KT- <i>fliF1</i> -KO	<i>fliF₁</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliF2</i> -KO	<i>fliF₂</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-cluster1-KO	cluster 1 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-cluster2-KO	cluster 2 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliM1</i> -KO	<i>fliM₁</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliM2</i> -KO	<i>fliM₂</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-flag-cluster1-KO	<i>flaAB₁</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-flag-cluster2-KO	<i>flaAB₂</i> Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-CheY1-KO	Sputcn32_2558 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-CheY2-KO	Sputcn32_3324 Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit

Konstrukte für „in frame“ Austausch spezifischer Reste in *FlaB* von *S. oneidensis* MR-1 und *CheY* von *S. putrefaciens* CN-32

pNPTS138-R6KT- SO <i>flaB</i> -S105A	Insertion von <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 105 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- SO <i>flaB</i> -S143A	Insertion von <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 143 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- SO <i>flaB</i> -S171A	Insertion von <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 171 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- SO <i>flaB</i> -S180A	Insertion von <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 180 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
pNPTS138-R6KT- SOflaB-S185A	Insertion von <i>flaB</i> mit substituiertem Serin zu Alanin an Position 185 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-CheY-GOF	Insertion von Sputcn32_2558 mit substituiertem Asparaginsäure zu Lysin an Position 12 und substituiertem Tyrosin zu Tryptophan an Position 106 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-CheY-LOF	Insertion von Sputcn32_2558 mit substituiertem Asparaginsäure zu Alanin an Position 56 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
Konstrukte für Fluoreszenzprotein-Fusionen <i>S. putrefaciens</i> CN-32		
pNPTS138-R6KT-FliM1-GL-VENUS-His6	FliM1-6xGly-Venus-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-FliM1-GL-CFP-His6	FliM1-6xGly-eCfp-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-FliM1-GL-sfGFP-His6	FliM1-6xGly-sfGfp-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-FliM1-GL-mCherrySO-His6	FliM1-6xGly-mCherrySO-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-FliM2-GL-VENUS-His6	FliM2-6xGly-Venus-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-FliM2-GL-CFP-His6	FliM2-6xGly-eCfp-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-FliM2-GL-sfGFP-His6	FliM2-6xGly-sfGfp-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-FliM2-GL-mCherrySO-His6	FliM2-6xGly-mCherrySO-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-CheY1-GL-VENUS-His6L	Sputcn32_2558-6xGly-Venus-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-CheY1-GL-CFP-His6L	Sputcn32_2558-6xGly-eCfp-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-CheY1-GL-sfGFP-His6L	Sputcn32_2558-6xGly-sfGfp-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-CheY1-GL-mCherrySO-His6L	Sputcn32_2558-6xGly-mCherrySO-His6 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-sfGfp-3GGs-cheY	<i>sfGfp</i> -His6-3xGly-Gly-Ser-Sputcn32_2558 in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-sfGfp-3GGs-cheY GOF	<i>sfGfp</i> -His6-3xGly-Gly-Ser-Sputcn32_2558_D12K/Y106W in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-sfGfp-3GGs-cheY LOF	<i>sfGfp</i> -His6-3xGly-Gly-Ser-Sputcn32_2558_D56N in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
Konstrukte für transkriptionelle Fusionen mit <i>luxCDABE</i>		
pBBR1-MCS5-TT-RBS-lux	<i>luxCDABE</i> -Kassette aus pUC18-miniTn7T-Gm-Lux in pBBR1-MCS5	[93]
pNTPS-R6KT-FliF-polar-RBS-Lux	Insertion <i>fliF</i> ₁ Fragment in pBBR1-MCS5-TT-RBS-Lux	[42]
pNTPS-R6KT-FliF-lateral-RBS-Lux	Insertion <i>fliF</i> ₂ Fragment in pBBR1-MCS5-TT-RBS-Lux	[42]
Lebendfluoreszenzmarkierung von <i>S. putrefaciens</i> CN-32		
pNPTS138-R6KT-glms-motP-sfGfp	<i>glms</i> Fragment für homologe Rekombination, <i>motAB</i> -Promotorregion aus <i>S. oneidensis</i> MR-1 vor <i>sfGfp</i> in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-glms-motP-mCherry	<i>glms</i> Fragment für homologe Rekombination, <i>motAB</i> -Promotorregion aus <i>S. oneidensis</i> MR-1 vor <i>mCherry</i> in pNPTS138-R6KT	Diese Arbeit
Überexpression der aminoterminalen Region von <i>FlaB</i> aus <i>S. oneidensis</i> MR-1		
pGEX-4T1-SO3237-Nterm	N-terminale Region von <i>flaB</i> in pGEX-4T-1	Diese Arbeit

4.1.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Eine vollständige Liste der für diese Arbeit relevanten Oligonukleotide ist in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9: Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' zu 3'	RS
Überproduktion von <i>S. oneidensis</i> MR-1 Flagellin FlaB (SO_3237) Domänen für Antikörperherstellung		
PstI-SO3237-Cterm-rev	AAA CTG CAG TAA TTG GTT AGC TTG CGC CAG	PstI
XhoI-SO3237-Cterm-fwd	AAA <u>CTC GAG</u> TTA AAG AAA ATC GAC GCA GCA ATC	XhoI
EcoRI-SO3237-Cterm-rev	A <u>GAA TTC</u> TAA TTG GTT AGC TTG CGC CAG	EcoRI
BamHI-SO3237-Cterm-fwd	A <u>GGA TCC</u> TTA AAG AAA ATC GAC GCA GCA ATC	BamHI
PstI-SO3237-Nterm-rev	ATA <u>CTG CAG</u> CGC TAA AAG CTT AGT TGT ACC G	PstI
XhoI-SO3237-Nterm-fwd	AAG <u>CTC GAG</u> ATT ACA GTT AAC ACT AAC GTC ACA TC	XhoI
EcoRI-SO3237-Nterm-rev	A <u>GAA TTC</u> CGC TAA AAG CTT AGT TGT ACC G	EcoRI
BamHI-SO3237-Nterm-fwd	A <u>GGA TCC</u> ATT ACA GTT AAC ACT AAC GTC ACA TC	BamHI
„In frame“ Deletionen in <i>S. putrefaciens</i> CN-32: laterales und polares Flagellencuster		
EcoRI-latFLAclus-fwd	A <u>GAA TTC</u> TGT GGT ATT GCC TCA CTC GCC	EcoRI
OL-latFLAclus-rev	CTA TGT CTC TGT CTG ATC AAA CAT TCT ATT CTG C	
OL-latFLAclus-fwd	GAT CAG ACA GAG ACA TAG ATC CCT CTC GCG	
PspOMI-latFLAclus-rev	T GTC <u>GGG CCC</u> ATT GCA CCA CAA TCA CAT CGG C	PspOMI
Check-latFLAclus-fwd	AAC GGT GTT CAA ATC GCC CAG	
Check-latFLAclus-rev	AAT CCA ATG TTT GAG CAC GGC G	
EcoRI-polFLAclus-fwd	A <u>GAA TTC</u> TAA AGG CTT CAG TAT CTG GCG	EcoRI
OL-polFLAclus-rev	TTG TGT GAG GCT TAA TCT CTA TTT CAG CTA GTC T	
OL-polFLAclus-fwd	AGA TTA AGC CTC ACA CAA CTC TAA ACT GTT GC	
PspOMI-polFLAclus-rev	T CTA <u>GGG CCC</u> TAT CAG TTC ATC GAC TCC CGC	PspOMI
Check-polFLAclus-fwd	TTA TGG TCA AAA GAT CAC GGC G	
Check-polFLAclus-rev	TCT TAG CCC CTA CAC TTC GC	
„In frame“ Deletionen in <i>S. putrefaciens</i> CN-32: Flagellengene des polaren und lateralen Flagellensystems		
BamHI-flagL-fwd	A <u>GGA TCC</u> TGA CAC TGT ATT TAT GGC GCA GG	BamHI
OL-flagL-rev	CAG TAG ACC GTG AAC ACC TAA CAT ATT AAT TCT CCA G	
OL-flagL-fwd	GGT GTT CAC GGT CTA CTG CGT TAA TCT AGC TC	
PspOMI-flagL-rev	T GTC <u>GGG CCC</u> GTC GCC GTC GCA TTT TCG C	PspOMI
Check-flagL-fwd	GTA TTA GCT TCG ATC GGG ATT GG	
Check-flagL-rev	GTT ACC CTT TGG CGC ATC GG	
EcoRI-flagP-fwd	A <u>GAA TTC</u> GAA GTT AAA GTG TCT GGG AAA CCC	EcoRI
OL-flagP-rev	TCA CCT CTT AAC TGT AAT AGC CAT AGT ATT TTC CTC	
OL-flagP-fwd	ATT ACA GTT AAG AGG TGA GAC AGT GAT AGG GA	
PspOMI-flagP-rev	T CTA <u>GGG CCC</u> TAA GCC TCT GTT TTC ATC AAA AGC C	PspOMI
Check-flagP-fwd	AAT TTT GAT GCG ACT ACC CCC G	
Check-flagP-rev	TAT CTA GAC CTG ACC CCA TGC C	
BamHI-fliM1-fwd	A <u>GGA TCC</u> AGA ACT TGA AAA TAC TGA TAC GCC TA	BamHI
OL-fliM1-rev	TTA TAA TTC ATC ACT CAC TAT ATT GCC TTA ACC TC	
OL-fliM1-fwd	GTG AGT GAT GAA TTA TAA GGT GAA GCA AGA TGA GC	
PspOMI-fliM1-rev	TCT <u>GGG CCC</u> GCA GTT GAT GCG ACT ACC GCA G	PspOMI
Check-fliM1-fwd	ATT <u>GAA GAG</u> CAC AGT GAA TGG CC	
Check-fliM1-rev	ACC AAG CAT ACT CGC CGC AGT	
EcoRI-fliM2-fwd	A <u>GAA TTC</u> CAG CAA AAC ATT ATA AAC TGC GGT A	EcoRI
OL-fliM2-rev	TCT CCT CAT TGC GGT TAT CTT CAT TTT ACT TCC	
OL-fliM2-fwd	ATA ACC GCA ATG AGG AGA ACG ACA TTG GCT G	
PspOMI-fliM2-rev	TCT <u>GGG CCC</u> AAA GCT AAT GGC TGT CAT GAG TG	PspOMI
Check-fliM2-fwd	ACC <u>ACA ATT</u> AAT CGT GAC ATC CTG	
Check-fliM2-rev	TGT TGT AAT CCT AGA GCC TGC C	
„In frame“ Deletionen in <i>S. putrefaciens</i> CN-32: Gene für putative Chemotaxiskomponenten		
EcoRI-Sputcn32_2558-cheY1-fwd	A <u>GAA TTC</u> TCG TCG AGG TGA TTG GGT TCC	EcoRI
OL-Sputcn32_2558-cheY1-rev	CTA AGC GAG GTC CAA GGT TTC CTC CGG TG	

Name	Sequenz 5' zu 3'	RS
OL-Sputcn32_2558-cheY1-fwd	ACC TTG GAC CTC GCT TAG GCA GGG ATG AG	
PspOMI-Sputcn32_2558-cheY1-rev	TCC <u>GGG CCC</u> ATC TTG AAA ATC CTG CGC CAT C	PspOMI
Check-Sputcn32_2558-cheY1-fwd	GAA ACC TTC GCT GGC ATA CG	
Check-Sputcn32_2558-cheY1-rev	TAA ATC GAT AAC ACG GCG GAT C	
EcoRI-Sputcn32_3324-cheY2-fwd	A <u>GAA TTC</u> TAC ACT GCC TCA TCC TAA GAC C	EcoRI
OL-Sputcn32_3324-cheY2-rev	GTT TTA TTC TAG ATG ACT CAT AGT TTT CGT CGG	
OL-Sputcn32_3324-cheY2-fwd	AGT CAT CTA GAA TAA AAC CTA AGT CAC GAA CCG	
PspOMI-Sputcn32_3324-cheY2-rev	TCA <u>GGG CCC</u> CAT TTC GAG TTG AGT TTT GCG C	PspOMI
Check-Sputcn32_3324-cheY2-fwd	TAA TGC GGT TAT ACT GGA CTC AG	
Check-Sputcn32_3324-cheY2-rev	TTT GGG TGT GCA TGA AAA TGG AG	
Fluoreszenzproteininfusionen in <i>S. putrefaciens</i> CN-32		
EcoRI-FliNp-fwd	A <u>GAA TTC</u> TTA CCG CTG TAA AAT GGG GCG	EcoRI
OL-GL-FliNp-rev	GCC GCC <u>GCC GCC</u> GCC GCC TTT AAG CTT TTT AAT TCG CTC AGT TTG	
OL-GL-VENUS-fwd	GGC GGC GGC GGC GGC GGC ATG GTG AGC AAG GGC GAG G	
OL-StrepL-VENUS-rev	TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
OL-StrepL-dwnFliNp-fwd	TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAA TAG ATG CAC ATG AGT TGG TAT ATG AG	
PspOMI-dwnFliNp-rev	T GTC <u>GGG CCC</u> AAC ACA CCA TCT GCC GCC C	PspOMI
Check-FliNp-tag-fwd	GAT GTA ATG AAC TTT AAA GCC GGT G	
Check-FliNp-tag-rev	ATA CTC TGT CGA ACC ATC GGC A	
Seq-VENUS-fwd	TTC AAG TCC GCC ATG CCC G	
Seq-VENUS-rev	TTC TTC TGC TTG TCG GCG G	
EcoRI-FliNlat-fwd	A <u>GAA TTC</u> AAC ATA ACA TCC CAG TAC ACT CCC	EcoRI
OL-GL-FliNlat-rev	GCC GCC GCC GCC GCC GCC TTC GTT AAT TGT CCC ATC CAG CG	
OL-StrepL-dwnFliNlat-fwd	TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAA ATG ATA GTT CGG CTG CTT TTA CTC T	
PspOMI-dwnFliNlat-rev	T GTC <u>GGG CCC</u> GTT CAC TCA ATA CAA ACG CAG GC	PspOMI
Check-FliNlat-tag-fwd	ATC AGA AGT AAG TGC AGA TTT ACC	
Check-FliNlat-tag-rev	ATA GCA TCA TCA TCC CCA TCG AC	
OL-GL-sfGFP-fwd	GGC GGC GGC GGC GGC GGC ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC AC	
OL-StrepL-sfGFP-rev	TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GG	
OL-GL-mCherry SO-fwd	GGC GGC GGC GGC GGC GGC ATG GTT TCC AAA GGG GAA GAG GA	
OL-StrepL-mCherry SO-rev	TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA TTT GTA TAA CTC ATC CAT ACC ACC AG	
Seq-sfGFP-fwd	AAA CTG AGC TTT CCT GAG GGC	
Seq-sfGFP-rev	ACT TGG GAA ATT GGT GCC ACG	
Seq-mCherry SO-fwd	ATG ACG GGA CCT ACA AGA CGC	
Seq-mCherry SO-rev	AAC CAT CTT CAA CGT TGT GGC G	
EcoRI-FliM1-fwd	G <u>GAA TTC</u> GAC TAT CTT GAC TCT GAA	EcoRI
OL-GL-FliM1-rev	GCC GCC GCC GCC GCC GCC TAA TTC AGA TAT ATC TCT AGC TTT GCC	
OL-His6L-VENUS-rev	TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
OL-His6L-dwnFliM1-fwd	CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA GGT GAA GCA AGA TGA	

Name	Sequenz 5' zu 3'	RS
PspOMI-dwnFliM1-rev	GCA CAG	PspOMI
Check-FliM1-tag-fwd	T GAC <u>GGG CCC</u> AAT CCC ACG GCA TTA GCC TG	
Check-FliM1-tag-rev	TGA GTT TAC CCC TAC TGA GCG	
	TTT GGC AGT TGA TGC GAC TAC C	
EcoRI-FliM2-fwd	G <u>GAA TTC</u> TTA AGG GAT CCT AGC CAG TCT G	EcoRI
OL-GL-FliM2-rev	GCC GCC GCC GCC GCC GCC AAT GTC GTT CTC CTC	
	ATA C	
OL-His6L-dwnFliM2-fwd	CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA ATG AGG AGA ACG ACA	PspOMI
	TTG GCT G	
PspOMI-dwnFliM2-rev	T GTC <u>GGG CCC</u> AAG CTA ATG GCT GTC ATG AGT G	
Check-FliM2-tag-fwd	GGA TAG <u>ATC GTT</u> GTA CGC TCG A	
Check-FliM2-tag-rev	TAG AGC CTG CCT TAG GAT GG	
OL-His6L-sfGFP-rev	TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG	
OL-His6L-mCherry SO-rev	TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG TTT GTA TAA CTC ATC	
	CAT ACC ACC AG	
EcoRI-cheY1-fwd	A <u>GAA TTC</u> AGT TAG CCA GAT ATT AAG TCA GGC	EcoRI
OL-GL-cheY1-rev	GCC GCC <u>GCC GCC</u> GCC GCC AGC GAG TCG TTC GAA TAT	
	TTT ATC	
OL-His6L-dwncheY1-fwd	CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA GCA GGG ATG AGC TAT	
Check-cheY1-tag-fwd	GAA GTC A	
	TTA TCG CTG TAC TAC GAT GAA GC	
EcoRI-cheY2-fwd neu	A <u>GAA TTC</u> ATT TTT AGA CAA TCA GGC GTA GTC G	EcoRI
OL-GL-cheY2-rev	GCC GCC <u>GCC GCC</u> GCC GCC CAG CTC TTA TTT CAA CTG	
	TTA GAA GAA	
OL-His6L-dwncheY2-fwd	CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA AAC CTA AGT CAC GAA	
Check-cheY2-tag-fwd	CCG AGT AA	
	CAT TCA GTT TAT GTT GGT GTC GAG	
EcoRI-pJP-Sputcn32_2726-gfp-fwd	A <u>GAA TTC</u> TTA GAA GTG ATC CGC GCT ATT GCC	EcoRI
BamHI-pJP-Sputcn32_2726-gfp-rev	T <u>GGA TCC</u> ATA TTT ACG TTG TAC ACT CTG TTG CC	BamHI
EcoRI-pJP-Sputcn32_2116-gfp-fwd	A <u>GAA TTC</u> ACT GAG AAA CTC GTT CAA GAG C	EcoRI
BamHI-pJP-Sputcn32_2116-gfp-rev	A <u>GGA TCC</u> GAT TTT AAA TTG ACC TAG TGT ATG GG	BamHI
EcoRI-pJP-cn32_0672-gfp-fwd	A <u>GAA TTC</u> AAA CGA TAA CGG CCA TTG ATG C	EcoRI
BamHI-pJP-cn32_0672-gfp-rev	C <u>GGA TCC</u> TAA CCT AAA GCC ACT CAG TGA CTT	BamHI
EcoRI-pJP-cn32_0796-gfp-fwd	A <u>GAA TTC</u> ACG ATA ATG CGC AGA GTG GTC	EcoRI
BamHI-pJP-cn32_0796-gfp-rev	C <u>GGA TCC</u> GAT TTT AAA ATT GCT TAC TGC GCG	BamHI
EcoRI-pJP-cn32_2637-gfp-fwd	A <u>GAA TTC</u> TAA GCA AAA TGG TGA AGA AGC CC	EcoRI
BamHI-pJP-cn32_2637-gfp-rev	C <u>GGA TCC</u> GGC TTT AAA TTG GCT TAT TTG ACG T	BamHI
EcoRI-pJP-cn32_3109-gfp-fwd	C <u>GAA TTC</u> CGT TAG CCT GTT CAG GTT CTG CG	EcoRI
BamHI-pJP-cn32_3109-gfp-rev	C <u>GGA TCC</u> TAC CTT ACG GAA GCG CTC TAC CA	BamHI
EcoRI-up-cheY1-fwd	A <u>GAA TTC</u> CGA GGT GAT TGG GTT CCA CG	EcoRI
OL-up-cheY1-rev	CTT GCT CAC CAT GGT TTC CTC CGG TGA GCT GA	
OL-CheY1-up-VENUS-fwd	CCG GAG GAA ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG G	
OL-GL-VENUS-rev	GCC GCC GCC GCC GCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
OL-GL-cheY1-Nterm-fwd	GGC GGC GGC GGC GGC TTG GAC AAG AAT ATG AAG ATT	
	CTC ATT	
PspOMI-cheY1-Nterm-rev	TCC <u>GGG CCC</u> GAA GTG GAG CTG CAA GTT CTC T	PspOMI
Check-cheY1-Nterm-tag-fwd	GTG GTG CCA TGC TGG ACG	
Check-Nterm-tag-cheY1-rev	GAG TGA GCT TAC CTA CCT CGT	

Name	Sequenz 5' zu 3'	RS
OL-up-cheY1-sfGfp-rev	TCC TTT GCT CAT GGT TTC CTC CGG TGA GCT GA	
OL-up-cheY1-mCherry-rev	TTT GGA AAC CAT GGT TTC CTC CGG TGA GCT GA	
OL-CheY1-up-sfGfp-fwd	CCG GAG GAA ACC ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC AC	
OL-CheY1-up-mCherry-fwd	CCG GAG GAA ACC ATG GTT TCC AAA GGG GAA GAG GA	
3x-GGS-OL-sfGFP-rev	GCT GCC GCC GCT GCC GCC GCT GCC GCC GTG GTG GTG GTG GTG GTG	
3x-GGS-OL-mCherrySO-rev	GCT GCC GCC GCT GCC GCC GCT GCC GCC TTT GTA TAA CTC ATC CAT ACC ACC AG	
EcoRI-cheZ1-fwd	A GAA TTC GAA TAC TGA CAT ACC TGA TGC GA	EcoRI
OL-GL-cheZ1-rev	GCC GCC GCC GCC GCC GAA ACC TAG ACT CGA TAG AAG ATC	
OL-His6L-dwncheZ1-fwd	CAC CAC CAC CAC CAC CAC TAA CTG GGA GTC AAT TTG ATG GCC T	
PspOMI-cheZ1-rev	TCC GGG CCC GCT TCC GCT TAT TTC CGT TGC	PspOMI
Check-cheZ1-tag-fwd	TGC ATT GAT GGA TTT TCA GGT CG	
Check-cheZ1-tag-rev	ATC TAA CAG TGC CTC AAA TTC CG	
EcoRI-up-cheZ1-fwd	A GAA TTC CGA ATC GCG AGT TAG CCA GAT	EcoRI
OL-up-cheZ1-rev	CTT GCT CAC CAT AGC TCA TCC CTG CCT AAG CG	
OL-CheZ1-up-VENUS-fwd	CAG GGA TGA GCT ATG GTG AGC AAG GGC GAG G	
OL-GL-cheZ1-Nterm-fwd	GGC GGC GGC GGC GGC ATG AAG TCA CAT ACA TCA GGG CT	
PspOMI-cheZ1-Nterm-rev	CTC GGG CCC TGA GAT CTT GAA AAT CCT GCG C	PspOMI
Check-cheZ1-Nterm-tag-fwd	GAG ATT GGC GCC ATT CTT GAA G	
Check-Nterm-tag-cheZ1-rev	TTA CTA AAT CGA TAA CAC GGC GG	
OL-up-fliM1-rev	CTT GCT CAC CAT TAT ATT GCC TTA ACC TCT TTA AGG TAC	
OL-fliM1-up-VENUS-fwd	TAA GGC AAT ATA ATG GTG AGC AAG GGC GAG G	
OL-GL-fliM1-Nterm-fwd	GGC GGC GGC GGC GGC GTG AGT GAT TTA TTA AGC CAA GAC G	
EcoRI-fliM1-Nterm-rev	CGA ATT CGA CAT CCA TGA CTG G	EcoRI
Check-Nterm-tag-fliM1-rev	GAC TGA CAA TAT TCG CCA TGG C	
OL-up-fliM2-rev	CTT GCT CAC CAT TTT ACT TCC TAT TAA ATG CAG TTT CAG	
OL-fliM2-up-VENUS-fwd	ATA GGA AGT AAA ATG GTG AGC AAG GGC GAG G	
OL-GL-fliM2-Nterm-fwd	GGC GGC GGC GGC GGC ATG AAG ATA ACC GCA AAA GCT CG	
PspOMI-fliM2-Nterm-rev	TCC GGG CCC TAA AAT TGA ACG ACC ATA CCG CC	PspOMI
Check-Nterm-tag-fliM2-rev	AAA AGC ATC GGT GGT GTT TGT GA	
EcoRI-Venus-fwd	A GAA TTC ATG GTG AGC AAG GGC GAG G	EcoRI
3x-GGS-OL-Venus-rev	GCT GCC GCC GCT GCC GCC GCT GCC GCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
3x-GGS-OL-CheY-fwd	GGC GGC AGC GGC GGC AGC GGC GGC AGC TTG GAC AAG AAT ATG AAG ATT CTC ATT	
4x-GGS-OL-Venus-rev	GCT GCC GCC GCT GCC GCC GCT GCC GCC GCT GCC GCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
OL-up-cheY1-sfGfp-rev	TCC TTT GCT CAT GGT TTC CTC CGG TGA GCT GA	
OL-up-cheY1-mCherry-rev	TTT GGA AAC CAT GGT TTC CTC CGG TGA GCT GA	
OL-CheY1-up-sfGfp-fwd	CCG GAG GAA ACC ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC AC	
OL-CheY1-up-mCherry-fwd	CCG GAG GAA ACC ATG GTT TCC AAA GGG GAA GAG GA	
3x-GGS-OL-sfGFP-rev	GCT GCC GCC GCT GCC GCC GCT GCC GCC GTG GTG GTG GTG GTG GTG	
3x-GGS-OL-mCherrySO-rev	GCT GCC GCC GCT GCC GCC GCT GCC GCC TTT GTA TAA CTC ATC CAT ACC ACC AG	
„In frame“ Substitutionen spezifischer Aminosäuren in CheY (Sputcn32_2558)		
CheY-D12K-rev	TGT TGA AAA TTT GTC AAC AAT GAG AAT C	
CheY-D12K-fwd	GTT GAC AAA TTT TCA ACA ATG AGA CG	
CheY-Y105W-rev	TAC GAC CCA GCC GTT TAC CC	

Name	Sequenz 5' zu 3'	RS
CheY-Y105W-fwd	GTA AAC GGC TGG GTC GTA AAA C	
CheY-D56N-rev	GGG CAT ATT CCA ATT TGT AAC AAC G	
CheY-D56N-fwd	GTT ACA AAT TGG AAT ATG CCC GG	
„In frame“ Substitutionen spezifischer Aminosäuren in FlaB (SO_3237)		
PstI-flaB-us-fwd	TCA CTG CAG GCC ATT AAA ACA ATT GAT AGC CAA CGT	PstI
flaB-S105A-rev	AGG CGT TGG CAC CGT TTT CAG	
flaB-S105A-fwd	AAA ACG GTG CCA ACG CCT CTG	
flaB-S143A-rev	TTA CCA GCA GCG AAA CCA CCC	
flaB-S143A-fwd	GTG GTT TCG CTG CTG GTA AGA	
flaB-S171A-rev	GAA CCG ACA GCT AAA GAA GAT TTG	
flaB-S171A-fwd	TCT TCT TTA GCT GTC GGT TCC TT	
flaB-S180A-rev	GGC AGC TGC TGT CGT ATT TC	
flaB-S180A-fwd	AAA TAC GAC AGC AGC TGC CC	
flaB-S185A-rev	ATT TTC TTT AAA GAT GCT GCT CGG G	
flaB-S185A-fwd	CGA GCA GCA TCT TTA AAG AAA ATC G	
flaB-S171-180A rev	GGC AGC TGC TGT CGT ATT TCC CAA GGA ACC GAC AGC	
	TAA AGA AGA TTT G	
flaB-S171-180A fwd	TCT TCT TTA GCT GTC GGT TCC TTG GGA AAT ACG ACA	
	GCA GCT GCC C	
EcoRI-flaB-ds-rev	C GAA TTC CTG CTA ATT TCA GTG CTT CCT CAC	EcoRI
Check-SO_flab-fwd	GTT GAA TAA CGC TAC GTC AGC A	
Check-SO_flab-rev	TTA CTG TGT GAG TTT TAA GCT TCT G	

4.1.3 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 10 gelistet.

Tabelle 10: Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Referenz
Lysogeny Broth (LB) (Luria/Miller)	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid pH-Wert	10 g/l 5 g/l 10 g/l 7,0 [28]
Super Optimal Broth (SOB)	Trypton Hefeextrakt Magnesiumchlorid Natriumchlorid Kaliumchlorid pH-Wert	20 g/l 5 g/l 0,95 g/l 0,5 g/l 0,186 g/l 7,0 [106]
Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC)	SOB Glukose	20 mM [106]
Lactate Medium (LM)	Hefeextrakt Pepton HEPES Natriumchlorid Laktat pH-Wert	0,2 g/l 0,1 g/l 10 mM 100 mM 15 mM 7,5 [270]
modifiziertes Myers and Myers Minimal Medium (4M)	NaCl Na ₂ EDTA KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ CaCl MnSO ₄	150 mM 67,2 µM 0,73 mM 1,27 mM 9 mM 0,5 mM 1 mM 1,3 µM [43, 90]

Bezeichnung	Zusammensetzung	Referenz
	FeCl ₂	5,4 µM
	CoCl ₂	5 µM
	ZnSO ₄	1 µM
	CuSO ₄	0,2µM
	H ₃ BO ₃	57 µM
	Na ₂ MoO ₄	3,9 µM
	NiCl ₂	5 µM
	NaSeO ₄	1,5 µM
	HEPES	10 mM
	Laktat <u>oder</u> N-Acetylglucosamin	40 mM
	pH-Wert	7,4

4.1.4 Antibiotika und Medienzusätze

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Medienzusätze sind in Tabelle 11 gelistet.

Tabelle 11: Antibiotika und Medienzusätze

Zusatz	Stammkonzentration	Endkonzentration	Lösungsmittel
Antibiotikum			
Ampicillin-Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml	ddH ₂ O
Chloramphenicol	30 mg/ml	30 µg/ml für <i>E. coli</i> 10 µg/ml für <i>Shewanella</i>	Ethanol 96 % (v/v)
Kanamycinsulfat	50 mg/ml	50 µg/ml	ddH ₂ O
Tetrazyclinhydrochlorid	10 mg/ml	2,5 µg/ml	Ethanol 96 % (v/v)
Gentamycinsulfat	10 mg/ml	10 µg/ml	ddH ₂ O
Induktoren und sonstige Zusätze			
2,6-Diaminopimelinsäure	60 mM	300 µM	ddH ₂ O
Saccharose	80 % (w/v)	10 % (w/v)	ddH ₂ O

4.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und Thermo Scientific Fermentas Molecular Biology Tools (St. Leon-Rot) bezogen. Polymerasekettenreaktionen wurden mit der Phusion von Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf) und der Taq-DNA-Polymerase von Thermo Scientific Fermentas Molecular Biology Tools (St. Leon-Rot) durchgeführt. Die Antarktische Phosphatase von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) wurde für Dephosphorylierungsreaktionen an Nukleinsäuren eingesetzt. Für Ligationen von Nukleinsäuren wurde die T4-DNA-Ligase von Thermo Scientific Fermentas Molecular Biology Tools (St. Leon-Rot) verwendet.

4.1.6 Kits

Kommerzielle Kits, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Kits

Kit und Firma	Verwendungszweck
DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Freiburg)	DNA-Aufreinigung
Zymo Clean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Freiburg)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg)	Isolierung von Plasmid-DNA
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Erlangen)	Chemilunineszentes Reagenz für HRP-abhängige Immunodetektion
CDP-Star® Reagent (New England Biolabs, Frankfurt am Main)	Chemilunineszentes Reagenz für AP-abhängige Immunodetektion
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I (Omega bio-tek, Darmstadt)	Isolierung von Plasmid-DNA
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega bio-tek, Darmstadt)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

4.1.7 Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Referenz
für Arbeiten mit Nukleinsäuren		
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	Tris Essigsäure EDTA pH TAE-Puffer	40 mM 20 mM 1mM 8,3 2 % (v/v)
5x DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau Glycerin Kaliumchlorid Manganchlorid	0.05 % (w/v) 50 % (v/v) 250 mM 55 mM
Transformationspuffer (TB)	Calciumchlorid Pipes pH-Wert	15 mM 10 mM 6,7
für Arbeiten mit Proteinen		
5x Protein-Ladepuffer	SDS Bromophenolblau Glycerol DTT Tris pH-Wert	10 % (w/v) 0,02 % (w/v) 50 % (w/v) 0,5 mM 0,313 M 6,8
10x Tris-Glycin-SDS-Puffer	Tris Glycin SDS pH-Wert	0,1 M 0,8 M 0,25 % (w/v) 8,3
Trenngelpuffer	Tris SDS pH-Wert	1,5 M 0,4 % (w/v) 8,8
Sammelpuffer	Tris SDS pH-Wert	0,5 M 0,4 % (w/v) 6,8

Bezeichnung	Zusammensetzung	Referenz
PBS(T)	NaCl	0,14 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	(Triton X-100)	0,5 % (w/v)
	pH Wert	7,3

4.1.8 Geräte

Geräte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 14 aufgelistet. Standardgeräte, die darüber hinaus verwendet wurden, sind gesondert im Text erwähnt.

Tabelle 14: Geräte

Gerät	Typ	Firma
Epifluoreszenzmikroskop (aufrecht)	Axio Imager.M1	Zeiss (Göttingen)
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite M200	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Konfokalmikroskop (invertiert)	TCS SP5	Leica Microsystems (Wetzlar)
Fluoreszenz- und Chemilumineszenz-Detektionsgerät	LAS-4000	FujiFilm (Düsseldorf)
Ultrazentrifuge	Optima™ L-90K	Beckman Coulter (Krefeld)
Agarosegel Dokumentationsgerät	2UV-Transilluminator	UVP (Upland, California, USA)
Waage	PM4800 DeltaRange	Mettler-Toledo (Gießen)
Feinwaage	AT261 DeltaRange	Mettler-Toledo (Gießen)
UV-Tisch	UVT_20LE	Herolab (Wiesloch)
pH-Meter	CyberScan 510	Thermo Scientific Eutech Instruments (Nijkerk, Niederlande)
Pipetten	Rainin	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipetierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Spektral-Photometer	Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
	Nano-Drop® ND-1000	Peqlab (Erlangen)

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt. *S. putrefaciens* CN-32, *S. oneidensis* MR-1 und *E. coli* wurden routinemäßig aerob in LB bei 30°C (*S. oneidensis* MR-1 und *S. putrefaciens* CN-32) oder 37°C (*E. coli*) kultiviert. Für spezielle Versuche wurden Shewanellen auch in LM oder 4M angezogen, was ebenfalls bei einer Temperatur von 30°C stattfand. Wann immer emerseres Wachstum notwendig war, wurde den entsprechenden Medien 1,5% Agar zugesetzt. Die Überwachung des Wachstums erfolgte durch Streumessungen im Photometer bei 600 nm. Zur Langzeitlagerung wurden Gefrierkulturen in 10 % DMSO (v/v) angefertigt und bei -80°C aufbewahrt.

4.2.2 Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme

Molekularbiologische Methoden, wie die Präparation von genomischer DNA und Klonierungsverfahren, wurden entsprechend Standardprotokollen [279, 297] oder nach Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Die verwendeten Enzyme, Puffer, Kits und Chemikalien sind in den Kapiteln 4.1.4 – 4.1.7 gesondert aufgeführt.

Transfer replikativer Plasmide

Replikative Plasmide wurden mittels Transformation in chemisch kompetente *E. coli* eingebracht [124].

„in frame“ Deletionen

In frame-Deletionsmutanten in *Shewanella* spp. wurden mittels zweifacher homologer Rekombination und unter Verbleib kleiner terminaler Gensequenzen (je 10 – 25 Bp) konstruiert [357, 360]. Hierzu wurden stromauf- und stromabwärts gelegene Sequenzen (je etwa 500 Bp lang) des zu deletierenden Gens in einer ersten PCR amplifiziert und nach Aufreinigung in einer „Overlap-PCR“ miteinander fusioniert [319]. Das so entstandene, sogenannte „Overlap“-Fragment, wurde nach Restriktion mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen mit dem Suizidvektor pNPTS138-R6KT [178] ligiert. Dieser Vektor trägt, neben einer Resistenzkassette gegen Kanamycin, das Gen *sacB*, welches für das Enzym Levansucrase codiert, das Saccharose zu einem für die Zellen toxischen Produkt umwandelt. Der resultierende Vektor wurde zunächst in *E. coli* DH5 α *λpir* transformiert, bevor er anschließend in einer zweiten Transformation in den, für Diaminopimelinsäure (DAP) auxotrophen, *E. coli* Stamm WM3064 transferiert wurde. Mittels konjugativer Paarung auf LB-Agar unter Zusatz von 300 μ M DAP erfolgte die Einschleusung des Suizidvektors in *Shewanella* und dort dessen ortsspezifische Integration in das Genom. Die Selektion der Bakterien mit chromosomal integriertem Plasmid (erste homologe Rekombination) fand durch das nachfolgende Wachstum auf LB-Agar unter Zusatz von Kanamycinsulfat statt. Im nächsten Schritt wurden Einzelkolonien ohne Selektionsdruck in LB für etwa 15 – 20 Replikationszyklen angezogen. Anschließend erfolgte die Selektion auf Zellen, welche das Plasmid verloren haben (zweite homologe Rekombination) durch das Wachstum auf LB-Agar unter Zusatz von 10 % (v/v) Saccharose. Saccharose-resistente aber Kanamycin-sensitive Stämme wurden im letzten Schritt mittels PCR auf Deletion des gewünschten Genabschnitts hin untersucht.

„In frame“ Insertionen

Zur „in frame“ Komplementation („knock-in“) wurde eine Kopie des zuvor deletierten Gens analog der eben beschriebenen Methode zur Erzeugung von „in frame“ Deletionen in seinen genetischen Kontext im *Shewanella* Genom reintegriert.

Genort-spezifische Mutagenese

Für den gerichteten Austausch einzelner Basenpaare in spezifischen Genen wurde die überlappende Extensions-PCR [1] eingesetzt. Die Überführung der Amplifikate in die entsprechenden Vektoren und die anschließende Einschleusung der Konstrukte in die entsprechenden Stämme erfolgte mittels der oben beschriebenen Techniken.

4.2.3 Konstruktion von transkriptionellen *lux*-Reporterfusionsproteinen

Um die Expression von Flagellenproteinen zu bestimmen, wurden transkriptionelle Reporterfusionsplasmide generiert [93] (beschrieben in [42]). Zur Quantifizierung der Expression *in trans* wurde zunächst ein Reporterplasmid konstruiert, in den das *lux*-Operon aus *Photobacterium luminescens* und eine transkriptionelle Terminorkassette aus dem Plasmid pUC18-mini-Tn7T-Gm-lux amplifiziert und in den Vektor pBBR1-MCS5 [172] über die Schnittstellen KpnI und SacI/XhoI kloniert wurde [93]. In den daraus resultierenden Vektor pBBR1-MCS5-TT-RBS-lux wurde anschließend der gewünschte Genabschnitt von *fliF*₁ und *fliF*₂ mit optimierter Ribosomenbindestelle (AGGAGG) über geeignete Restriktionsschnittstellen ligiert. Zur Integration der *lux*-Fusion in das Genom von *S. putrefaciens* CN-32 wurde das Plasmid mit PstI und SphI verdaut und das Fusionsfragment in den Suizidvektor pNPTS138-R6KT einkloniert. Der resultierende Vektor pNPTS138-R6KT-*fliF*₁-RBS-*lux*, bzw. pNPTS138-R6KT-*fliF*₂-RBS-*lux* wurde anschließend über einfache homologe Rekombination in das Chromosom von *S. putrefaciens* CN-32 integriert.

4.2.4 Konstruktion von Fluoreszenzprotein-Fusionen

FliM

Zur mikroskopischen Visualisierung von Rotorkomponenten wurde FliM₁, sowie FliM₂ C-terminal mit den Fluorophor-Proteinen Venus, Cfp, sfGfp oder mCherrySO fusioniert. Die Fluorophore sind dabei stets mit dem markierten Protein über einen 6-fachen Glycin-Linker (6x Gly) verbunden. Das Fluorophor wurde jeweils mit einem carboxyterminalen 6-fach Histidin (His6) Anhang versehen. Die dafür verwendeten Primer, sowie die daraus resultierenden Plasmide und Stämme sind jeweils in Tabelle 9, Tabelle 7 und Tabelle 8 zu finden.

CheY

Für die intrazelluläre Visualisierung von CheY wurde zunächst eine carboxyterminale Fusion mit Venus, Cfp, sfGfp oder mCherrySO, verbunden über einen 5-fach Glycin-Linker (5x Gly), durchgeführt. Aufgrund der stark eingeschränkten Funktionalität der Fusionsproteine wurde daraufhin eine aminoternale Fusion von CheY mit sfGfp erstellt. Der Linker besteht dabei in diesem Fall aus einem 3-fachen Glycin-Glycin-Serin-Linker (3GGS). Ein zusätzlicher carboxyterminaler Linker zur immunologischen Detektion wurde nicht angefügt. Die dafür

verwendeten Primer, sowie die daraus resultierenden Plasmide und Stämme sind ebenfalls in Tabelle 9, Tabelle 7 und Tabelle 8 zu finden.

4.2.5 Analyse der Expressionseffizienz mittels des *lux*-basierten Reportersystems

Zur Messung der transkriptionellen *lux*-Reporterfusionen wurden zunächst die Zellen einer Übernacht-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,02 mit dem gewünschten Medium verdünnt. Anschließend wurden jeweils 160 µl der Zellsuspension in die Wells einer weißen 96-well-Polystyren-Mikrotiterplatte (Greiner Bio One, Frickenhausen) transferiert und die Lumineszenz anschließend am Tecan Infinite M200 Plattenlesegerät bestimmt. Die relativen Lumineszenzeinheiten (rLE) berechneten sich aus der ermittelten Lumineszenz in Relation zur optischen Dichte der analysierten Kultur. Für Messungen der Lumineszenz von Oberflächen-adhärenzten Zellen wurde zunächst eine Übernachtkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 verdünnt und anschließend auf eine LB-Platte mit 1% (w/v) Agar ausplattiert. Nach Inkubation der Platten für die angegebene Zeit bei 30°C, wurden die Zellen von der Agaroberfläche mit frischem LB abgewaschen und die Lumineszenz analog zu oben bestimmt. Alle Messungen wurden in mindestens vier Replikaten mit je zwei biologischen Duplikaten durchgeführt.

4.2.6 Lebendfluoreszenzmarkierung von *S. putrefaciens* CN-32

Zur qualitativen Bestimmung der Zusammensetzung von Zell-Populationen wurden Stämme von *S. putrefaciens* CN-32 lebendfluoreszenzmarkiert. Zu diesem Zweck wurde ein Reporterplasmid konstruiert, das über einfache homologe Rekombination in das Genom von *S. putrefaciens* CN-32 inseriert wurde. Als spezifischer Rekombinationsort diente die 1000-Bp einfassende 3'-terminale Region des *glmS* Gens. Dieser spezifische Genlocus dient auch zur spezifischen Insertion des Tn7-Transposons [265]. Zur konstitutiven Expression von *sfGfp* oder *mCherrySO* wurde der, in *S. oneidensis* MR-1 konstitutive, *motAB*-Promotor (MotP) verwendet. Die transkriptionelle Fusion der Promotor-Region mit den Fluorophor-Genen ermöglichte, nach *in cis* Insertion in das *S. putrefaciens* CN-32 Genom, die konstitutive Produktion von sfGfp, bzw. mCherrySO.

4.2.7 Motilitäts-Assays

Zur Untersuchung der Motilität von *S. putrefaciens* CN-32 oder *S. oneidensis* MR-1 wurden 3 µl des entsprechenden Stammes auf 4M-, LM-, oder LB-Weichagarplatten [270] getropft und für 16 h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Grad der Motilität durch die Auswertung der Schwimmradien bestimmt.

Zur Bestimmung der Schwimmmotilität in Flüssigkultur wurden zunächst Objektträger vorbereitet, auf denen vier Silikontropfen (15-30 µl) aufgetropft wurden. Im Anschluss wurden Deckgläschen (60 × 24 mm) aufgelegt und gleichmäßig angedrückt, bevor die Träger bei RT für

mindestens vier Stunden getrocknet wurden. LB- oder LM₁₀₀-Medium wurde mit 1×10^8 Zellen einer Übernachtskultur inokuliert und die Zellen bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 bei 30°C inkubiert. Ein Aliquot von 400 µl Kultur wurde anschließend unter das Deckgläschen des vorbereiteten Objektträgers pipettiert und augenblicklich am Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M1 Mikroskop, Zeiss, Wetzlar) unter Zuhilfenahme eines 40 ×-Differenzial-Interferenz-Kontrast (DIC)-Objektivs analysiert. Zur Analyse der Schwimmgeschwindigkeit der Zellen wurden Filme mit einer Dauer von 20 s und einer Bildfrequenz von 0,17 s aufgenommen und einzelne Zellen mit Hilfe der MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software (V. 7.5.4.0) verfolgt. Die Geschwindigkeit wurde mittels der Software-eigenen Skalierungs-Anwendungen über die zurückgelegte Strecke pro Bildfrequenz bestimmt.

4.2.8 Flagellenfärbung

Die Färbung der Flagellenfilamente erfolgte wie bereits beschrieben [114]. Dazu wurden Flagellen-Extrakte oder exponentiell-gewachsene Kulturen auf einem Objektträger durch Antrocknen immobilisiert und nachfolgend mit „Ryu-Stain“ gefärbt. Die Visualisierung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M1, Zeiss, Wetzlar) unter Zuhilfenahme eines Zeiss Plan Apochromate 100×/1.4 DIC- oder Phasenkontrast (PC)-Objektivs.

4.2.9 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Ansätze wurden zunächst die Zellen auf 1%-igem Agarose-LM immobilisiert. Die Detektion erfolgte am Axio Imager.M1 Mikroskop (Zeiss, Wetzlar) mittels eines Zeiss Plan Apochromat 100 ×/1.4 DIC Objektivs. Die Bildbearbeitungen wurden unter Zuhilfenahme von MetaMorph® 7.5.4.0, Adobe Photoshop CS2 und Adobe Illustrator CS2/CS5 durchgeführt. Für Lokalisierungsstudien wurden mindestens 300 Zellen pro Ansatz ausgezählt. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Analysen mittels Photobleaching wurden analog zu [190] durchgeführt.

Zur Analyse des Schwimmverhaltens mehrerer Zellen in einer Kultur wurden Videos mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar) aufgenommen. Dafür wurden die Zellen analog zu Kapitel 4.2.7 vorbereitet. Der Leica TCS SP5 eigene „*resonant scanner*“ wurde verwendet, um eine Bildrate von 27 Bildern pro s zu erreichen.

Transmissionselektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Analysen wurden zunächst Zellen bis zur exponentiellen Phase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von 1,25 % (v/v) Glutaraldehyd fixiert und nach 15 min Inkubation in LM gewaschen. Nach Resuspendierung des Zellpellets in 50 µl LM wurden 5 µl der Zellsuspension auf ein Kohlenstoff-beschichtetes Kupfergitter (400 Maschen; Plano, Wetzlar) getropft und augenblicklich zweimal mit zweifach-

destilliertem Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Uranylacetat (2% (v/v)) für 20 s negativ kontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten unter Einsatz des Transmissionselektronenmikroskops JEOL 2100 TEM (ausgestattet mit einer LaB6 Kathode; JEOL, Tokyo, Japan) mittels einer $2k \times 2k$ Kamera F214 in Kombination mit der EM-Menu 4 Software (TVIPS, Gauting, Germany). Die Elektronenmikroskopie wurde von Andreas Klingl (AG Maier, Philips-Universität Marburg) durchgeführt.

4.2.10 Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Überproduktion

Für die Überproduktion der N-terminalen Domäne des Flagellins FlaB aus *S. oneidensis* MR-1, wurde der entsprechende Bereich durch das Einbringen in den Überexpressionsvektor pGEX-4T-1 (GE Healthcare, Freiburg), carboxyterminal mit der Glutathion S-Transferase (GST) fusioniert anschließend in *E. coli* DH5 α λ pir überproduziert. Die Anzucht erfolgte in LB bei 37°C. Nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurden zur Induktion der Proteinüberproduktion IPTG in einer finalen Konzentration von 1 mM zugesetzt. Nach der Induktion erfolgte weiteres Wachstum von 4 h unter Induktionsbedingungen und daraufhin die Zellernte bei $3.000 \times g$ für 8 min bei 4°C.

Aufreinigung

Für die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins wurden die Zellen in PBS mit 0,2 mM PMSF resuspendiert und mithilfe des „Branson Sonifier“ Ultraschallgeräts auf Eis aufgeschlossen (6×10 s). Nach dem Zellaufschluss wurden die löslichen Proteine (Überstand) von den Zelltrümmern (Pellet) durch Zentrifugation bei $8.000 \times g$ getrennt. Die im Überstand enthaltenen GST-FlaB-N-term Fusionsproteine wurden mithilfe des GST-Bind™ Resin (Novagen, Darmstadt), den Herstellerangaben folgend, im „Batch“-Verfahren aufgereinigt. Zur Überprüfung der Aufreinigung auf Vorhandensein des Fusionsproteins, wurden Teile der Proben mit 5-fach Protein-Ladepuffer (s. Tabelle 13) versetzt und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [176] aufgetrennt. Die Kurzzeit-Lagerung des aufgereinigten Proteins fand bei 4°C statt.

4.2.11 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Konzentration von spezifischen Proteinen in Proben wurde eine BSA-Vergleichskonzentrations-Verdünnungsreihe erstellt und Protein-Proben, sowie BSA-Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Konzentration des Proteins nach „Roti®-Blue“-Färbung (Roth, Karlsruhe) überprüft. Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Proben wurde der „BCA Protein Assay Reagent“ (Thermo Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben verwendet.

4.2.12 Herstellung spezifischer Antikörper

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern mit spezifischem Epitop gegen den N-terminalen Bereich von FlaB wurden 400 µg aufgereinigtes Protein Fusionsprotein wie zuvor beschrieben isoliert und anschließend als Antigen von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt.

4.2.13 Western-Blot Analysen

Zur Bestimmung der Stabilität der Fluorophor-Fusionsproteine und zur Überprüfung der molekularen Masse von Flagellinen wurden Immunoblots durchgeführt. Dazu wurden 1×10^{10} Zellen einer exponentiell-wachsenden Kultur in LB geerntet, in SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 99°C für 5 min aufgeköcht. Anschließend wurden 10 µl des Zelllysats in einem 11 – 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt, um die Proteine anschließend auf eine Nitrozellulosemembran (Immobilon-P; Millipore, Schwalbach) zu transferieren. Für die Detektion von modifiziertem oder nicht-modifiziertem Flagellin, wurden FlaB-N-term-spezifische Antikörper der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) in einer Verdünnung von 1:500 (Serum) verwendet. Zur Detektion der Fluorophor-Fusionsproteine wurden polyklonale Antikörper gegen Rfp (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln), bzw. Gfp (Roche GmbH, Mannheim) in der Verdünnung 1:10.000 bzw. 1:5.000 verwendet. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem polyklonalen Ziege-anti-Kaninchen Immunglobulin G-HRP-konjugiertem Zweitantikörper (Verdünnung 1:20.000; Thermo Fischer Scientific, Schwerte). Zur Detektion des GFP-Antikörpers von Roche, wurde der anti-Maus Immunglobulin G-HRP-konjugierte Zweitantikörper in der Verdünnung 1:2.500 verwendet. Das Signal wurde mit dem „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate“ (Thermo Scientific, Schwerte) entsprechend der Herstellerangaben entwickelt und im CCD System LAS_4000 (Fujifilm, Düsseldorf) dokumentiert.

4.2.14 Aufreinigung von Flagellenfilamenten

Zur Aufreinigung von nativen Flagellenfilamenten wurde ein modifiziertes Protokoll nach Schirm *et al.* verwendet [309]. Für die Isolation von Flagellen wurde ein Stamm ohne zusätzliche Zell-Anhänge verwendet ($\Delta pilM-Q \Delta mshA$). Zur optimalen Ausbeute wurden Zellen mit Flagellen durch das wiederholte Passagieren auf Schwimmplatten angereichert. Vorkulturen wurden mit Zellen vom äußeren Rand der Schwimmradien in LB inokuliert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,6 wurde die Hauptkultur durch Zentrifugation bei $13.000 \times g$ für 30 min sedimentiert und anschließend in TBS (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5) resuspendiert. Die Flagellen wurden durch Scherkräfte während des Vortexens bei 4°C für 1 h vom Zellkörper abgetrennt. Lösliche Flagellen (Überstand) und Zellen (Pellet) wurden nachfolgend durch Zentrifugation bei $6000 \times g$ getrennt. Die Flagellen im Überstand wurden in einem finalen Ultrazentrifugationsschritt bei $120.000 \times g$ pelletiert. Das Pellet mit dem rohen Flagellen-Extrakt wurde in 200 µl TBS aufgenommen und für Langzeit-Aufbewahrung bei -20°C eingefroren. Die

erfolgreiche Aufreinigung wurde stets durch mikroskopische Untersuchung nach Flagellenfärbung und durch SDS-PAGE dokumentiert [114, 176].

4.2.15 Konkurrenzversuche mit lebendfluoreszenzmarkierten Zellen

Für die Konkurrenzversuche wurden lebendfluoreszenzmarkierte Zellen (siehe 4.2.6) des Wildtyps und der Stämme $\Delta flaAB_1$ und $\Delta flaAB_2$ verwendet. Die Versuche wurden entweder in Weichagarplatten oder in μ -Slide Kammern (Artikelnummer 80666, μ -Slide VI 0,1, ibiTreat, *tissue culture treated*) der Firma Ibidi (Planegg/Martinsried) verwendet (s. Abb. 37).



Abb. 37: μ -Slide VI 0,1.

Weichagar

Für die Analyse der Populationszusammensetzung wurden $\bar{u}N$ -Kulturen des Wildtyps, bzw. der $flaAB_1$ - und $flaAB_2$ -Mutante in LB bei 30°C inkubiert. Eine Vorkultur der entsprechenden Stämme wurde ebenfalls bei 30°C bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert und die Zellen nach Überprüfung der OD bei 600 nm im 1:1 Verhältnis gemischt. So entstanden folgende Co-Kulturen: WT-MotP::*yGfp*/ $\Delta flaAB_1$ -MotP::*mCherrySO*, WT-MotP::*yGfp*/ $\Delta flaAB_2$ -MotP::*mCherrySO*, WT-MotP::*mCherrySO*/ $\Delta flaAB_1$ -MotP::*yGfp*, WT-MotP::*mCherrySO*/ $\Delta flaAB_2$ -MotP::*yGfp*. Jeweils 3 μ l der Kulturen wurden wie oben beschrieben auf Weichagar aufgetropft und 16 h bei RT inkubiert. Zur Auswertung der Populationszusammensetzung in den Schwimmradien wurden aus dem äußeren, einem mittleren und dem inneren Bereich Zellen isoliert, indem jeweils 2 μ l Flüssigkeit mit Pipetten aus den entsprechenden Bereichen vorsichtig entnommen wurde. Die anschließende Fluoreszenzmikroskopie wurde analog zu Kapitel 4.2.9 durch geführt. Die relative Populationszusammensetzung im inneren, äußeren oder mittleren Bereich des Schwimmradius wurde dann durch die Errechnung des prozentualen Anteils angegeben.

Planktonische Kultur

Für die Analyse der Populationszusammensetzung nach einem Konkurrenzversuch in planktonischer Kultur wurden die gleichen Stämme, wie für Weichagar, verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine 1:1 Population aus WT-MotP::*yGfp*/WT-MotP::*mCherrySO* verwendet. Für einen Versuch wurden Zellen $\bar{u}T$ in die spätlogarithmische Phase bei 30°C in LB angezogen und anschließend bei $2.000 \times g$ pelletiert. Durch vorsichtiges Resuspendieren in LB+Cm15 (15 μ g/ml Chloramphenicol zur Inhibierung des Zellwachstums) wurden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 10

ankonzentriert. Die μ -Slide Kammern wurden durch das Spülen mit LB+Cm15 vorbereitet. Die dünnen Kanäle wurden dadurch mit Medium befüllt. Überschüssiges Medium wurde abgenommen und durch ein definiertes Volumen von 50 μ l LB+Cm15 pro Well ersetzt. Die ankonzentrierten Kulturen wurden im 1:1-Verhältnis gemischt und jeweils 3 μ l der daraus resultierenden Zellsuspension in ein Well (Start-Well) pipettiert. Nach einer Inkubation üN bei RT wurde aus dem gegenüberliegenden Well (Ziel-Well) Medium entnommen. Die Populationszusammensetzung der Zellen, die durch den Kanal in das Ziel-Well geschwommen sind wurde wie oben beschrieben fluoreszenzmikroskopisch untersucht und der prozentuale Anteil errechnet.

5 Quellenverzeichnis

1. Aiyar, A., Y. Xiang, and J. Leis (1996). "Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR." *Methods Mol Biol* **57**: 177-91.
2. Aizawa, S.I., G.E. Dean, C.J. Jones, R.M. Macnab, and S. Yamaguchi (1985). "Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **161**(3): 836-49.
3. Aldridge, P. and K.T. Hughes (2002). "Regulation of flagellar assembly." *Curr Opin Microbiol* **5**(2): 160-5.
4. Alexander, R.P. and I.B. Zhulin (2007). "Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(8): 2885-90.
5. Alexandre, G., R. Rohr, and R. Bally (1999). "A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella." *Appl Environ Microbiol* **65**(10): 4701-4.
6. Allen, R.D. and P. Baumann (1971). "Structure and arrangement of flagella in species of the genus *Beneckea* and *Photobacterium fischeri*." *J Bacteriol* **107**(1): 295-302.
7. Altarriba, M., S. Merino, R. Gavin, R. Canals, A. Rabaan, J.G. Shaw, and J.M. Tomas (2003). "A polar flagella operon (*flg*) of *Aeromonas hydrophila* contains genes required for lateral flagella expression." *Microb Pathog* **34**(5): 249-59.
8. Amin, D.N. and G.L. Hazelbauer (2010). "The chemoreceptor dimer is the unit of conformational coupling and transmembrane signaling." *J Bacteriol* **192**(5): 1193-200.
9. Anand, G.S. and A.M. Stock (2002). "Kinetic basis for the stimulatory effect of phosphorylation on the methylesterase activity of CheB." *Biochemistry* **41**(21): 6752-60.
10. Anderson, J.K., T.G. Smith, and T.R. Hoover (2010). "Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation." *Trends Microbiol* **18**(1): 30-7.
11. Armitage, J.P. (1999). "Bacterial tactic responses." *Adv Microb Physiol* **41**: 229-89.
12. Arnold, R.G., T.J. DiChristina, and M.R. Hoffmann (1988). "Reductive dissolution of Fe(III) oxides by *Pseudomonas* sp. 200." *Biotechnol Bioeng* **32**(9): 1081-96.
13. Arnosti, D.N. (1990). "Regulation of *Escherichia coli* sigma F RNA polymerase by *flhD* and *flhC* flagellar regulatory genes." *J Bacteriol* **172**(7): 4106-8.
14. Arora, S.K., A.N. Neely, B. Blair, S. Lory, and R. Ramphal (2005). "Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections." *Infect Immun* **73**(7): 4395-8.
15. Asakura, S. (1970). "Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella." *Adv Biophys* **1**: 99-155.
16. Atsumi, T., Y. Maekawa, T. Yamada, I. Kawagishi, Y. Imae, and M. Homma (1996). "Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*." *J Bacteriol* **178**(16): 5024-6.
17. Atsumi, T., L. McCarter, and Y. Imae (1992). "Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces." *Nature* **355**(6356): 182-4.
18. Avery, S.V. (2006). "Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity." *Nat Rev Microbiol* **4**(8): 577-87.
19. Baraquet, C., L. Theraulaz, C. Iobbi-Nivol, V. Mejean, and C. Jourlin-Castelli (2009). "Unexpected chemoreceptors mediate energy taxis towards electron acceptors in *Shewanella oneidensis*." *Mol Microbiol* **73**(2): 278-90.
20. Barbara, G.M. and J.G. Mitchell (2003). "Bacterial tracking of motile algae." *FEMS Microbiol Ecol* **44**(1): 79-87.
21. Bardy, S.L., S.Y. Ng, and K.F. Jarrell (2003). "Prokaryotic motility structures." *Microbiology* **149**(Pt 2): 295-304.
22. Baumann, L., P. Baumann, M. Mandel, and R.D. Allen (1972). "Taxonomy of aerobic marine eubacteria." *J Bacteriol* **110**(1): 402-29.
23. Belas, R., M. Simon, and M. Silverman (1986). "Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*." *J Bacteriol* **167**(1): 210-8.
24. Bencharit, S. and M.J. Ward (2005). "Chemotactic responses to metals and anaerobic electron acceptors in *Shewanella oneidensis* MR-1." *J Bacteriol* **187**(14): 5049-53.
25. Berg, H.C. (2003). "The rotary motor of bacterial flagella." *Annu Rev Biochem* **72**: 19-54.
26. Berg, H.C. and L. Turner (1990). "Chemotaxis of bacteria in glass capillary arrays. *Escherichia coli*, motility, microchannel plate, and light scattering." *Biophys J* **58**(4): 919-30.
27. Berleman, J.E. and C.E. Bauer (2005). "A *che*-like signal transduction cascade involved in controlling flagella biosynthesis in *Rhodospirillum centenum*." *Mol Microbiol* **55**(5): 1390-402.
28. Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **62**(3): 293-300.
29. Blair, D.F. and H.C. Berg (1990). "The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor." *Cell* **60**(3): 439-49.
30. Blair, K.M., L. Turner, J.T. Winkelman, H.C. Berg, and D.B. Kearns (2008). "A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm." *Science* **320**(5883): 1636-8.
31. Borkovich, K.A. and M.I. Simon (1990). "The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis." *Cell* **63**(6): 1339-48.
32. Boukhalfa, H., G.A. Icopini, S.D. Reilly, and M.P. Neu (2007). "Plutonium(IV) reduction by the metal-reducing bacteria *Geobacter metallireducens* GS15 and *Shewanella oneidensis* MR1." *Appl Environ Microbiol* **73**(18): 5897-5903.
33. Bowman, J.P., S.A. McCammon, D.S. Nichols, J.H. Skerratt, S.M. Rea, P.D. Nichols, and T.A. McMeekin (1997). "*Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 omega 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction." *Int J Syst Bacteriol* **47**(4): 1040-7.
34. Bozal, N., M.J. Montes, D. Minana-Galbis, A. Manresa, and E. Mercade (2009). "*Shewanella vesiculosa* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area." *Int J Syst Evol Microbiol* **59**(Pt 2): 336-40.
35. Braun, T.F., L.Q. Al-Mawsawi, S. Kojima, and D.F. Blair (2004). "Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **43**(1): 35-45.

36. **Bray, D., M.D. Levin, and C.J. Morton-Firth** (1998). "Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity." *Nature* **393**(6680): 85-8.
37. **Brenzinger geb. Held, S.** (2011). "Two stator complexes contribute to motility in *Shewanella putrefaciens* CN-32." *Master of Science Arbeit*.
38. **Brettar, I., R. Christen, and M.G. Hofle** (2002). "*Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea." *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(Pt 6): 2211-7.
39. **Brettar, I., E.R. Moore, and M.G. Hofle** (2001). "Phylogeny and Abundance of Novel Denitrifying Bacteria Isolated from the Water Column of the Central Baltic Sea." *Microb Ecol* **42**(3): 295-305.
40. **Briegleb, A., D.R. Ortega, E.I. Tocheva, K. Wuichet, Z. Li, S. Chen, A. Muller, C.V. Iancu, G.E. Murphy, M.J. Dobro, I.B. Zhulin, and G.J. Jensen** (2009). "Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(40): 17181-6.
41. **Brown, P.N., M. Terrazas, K. Paul, and D.F. Blair** (2007). "Mutational analysis of the flagellar protein FliG: sites of interaction with FliM and implications for organization of the switch complex." *J Bacteriol* **189**(2): 305-12.
42. **Bubendorfer, S.** (2010). "Flagelle, Biofilmbildung und Chemotaxis: Studien an zwei *Shewanella* Spezies." *Master of Science Arbeit*.
43. **Bubendorfer, S., S. Held, N. Windel, A. Paulick, A. Klingl, and K.M. Thormann** (2012). "Specificity of motor components in the dual flagellar system of *Shewanella putrefaciens* CN-32." *Mol Microbiol* **83**(2): 335-50.
44. **Buck, M., M.T. Gallegos, D.J. Studholme, Y. Guo, and J.D. Gralla** (2000). "The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor." *J Bacteriol* **182**(15): 4129-36.
45. **Caccavo, F., R.P. Blakemore, and D.R. Lovley** (1992). "A Hydrogen-Oxidizing, Fe(III)-Reducing Microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire." *Appl Environ Microbiol* **58**(10): 3211-6.
46. **Cahn, F.H. and M.S. Fox** (1968). "Fractionation of transformable bacteria from ocompetent cultures of *Bacillus subtilis* on renografin gradients." *J Bacteriol* **95**(3): 867-75.
47. **Calladine, C.R.** (1975). "Construction of bacterial flagella." *Nature* **255**(5504): 121-4.
48. **Canals, R., M. Altarriba, S. Vilches, G. Horsburgh, J.G. Shaw, J.M. Tomas, and S. Merino** (2006). "Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3." *J Bacteriol* **188**(3): 852-62.
49. **Canals, R., S. Ramirez, S. Vilches, G. Horsburgh, J.G. Shaw, J.M. Tomas, and S. Merino** (2006). "Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*." *J Bacteriol* **188**(2): 542-55.
50. **Carpentier, W., K. Sandra, I. De Smet, A. Brige, L. De Smet, and J. Van Beeumen** (2003). "Microbial reduction and precipitation of vanadium by *Shewanella oneidensis*." *Appl Environ Microbiol* **69**(6): 3636-9.
51. **Chang, H.W., S.W. Roh, K.H. Kim, Y.D. Nam, C.O. Jeon, H.M. Oh, and J.W. Bae** (2008). "*Shewanella basaltis* sp. nov., a marine bacterium isolated from black sand." *Int J Syst Evol Microbiol* **58**(Pt 8): 1907-10.
52. **Chao, L. and B.R. Levin** (1981). "Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10): 6324-8.
53. **Chou, W.K., S. Dick, W.W. Wakarchuk, and M.E. Tanner** (2005). "Identification and characterization of NeuB3 from *Campylobacter jejuni* as a pseudaminic acid synthase." *J Biol Chem* **280**(43): 35922-8.
54. **Chun, S.Y. and J.S. Parkinson** (1988). "Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein." *Science* **239**(4837): 276-8.
55. **Cohen-Ben-Lulu, G.N., N.R. Francis, E. Shimoni, D. Noy, Y. Davidov, K. Prasad, Y. Sagi, G. Cecchini, R.M. Johnstone, and M. Eisenbach** (2008). "The bacterial flagellar switch complex is getting more complex." *EMBO J* **27**(7): 1134-44.
56. **Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, and H.M. Lappin-Scott** (1995). "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-45.
57. **Darnton, N.C. and H.C. Berg** (2007). "Force-extension measurements on bacterial flagella: triggering polymorphic transformations." *Biophys J* **92**(6): 2230-6.
58. **Darnton, N.C., L. Turner, S. Rojevsky, and H.C. Berg** (2007). "On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **189**(5): 1756-64.
59. **Dasgupta, N., M.C. Wolfgang, A.L. Goodman, S.K. Arora, J. Jyot, S. Lory, and R. Ramphal** (2003). "A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol Microbiol* **50**(3): 809-24.
60. **de Jong, I.G., P. Haccou, and O.P. Kuipers** (2011). "Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies." *Bioessays* **33**(3): 215-23.
61. **De Mot, R. and J. Vanderleyden** (1994). "The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan." *Mol Microbiol* **12**(2): 333-4.
62. **Deakin, W.J., V.E. Parker, E.L. Wright, K.J. Ashcroft, G.J. Loake, and C.H. Shaw** (1999). "*Agrobacterium tumefaciens* possesses a fourth flagelin gene located in a large gene cluster concerned with flagellar structure, assembly and motility." *Microbiology* **145** (Pt 6): 1397-407.
63. **Dean, G.E., R.M. Macnab, J. Stader, P. Matsumura, and C. Burks** (1984). "Gene sequence and predicted amino acid sequence of the motA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **159**(3): 991-9.
64. **Delalez, N.J., G.H. Wadhams, G. Rosser, Q. Xue, M.T. Brown, I.M. Dobbie, R.M. Berry, M.C. Leake, and J.P. Armitage** (2010). "Signal-dependent turnover of the bacterial flagellar switch protein FliM." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(25): 11347-51.
65. **DeLong, E.F., D.G. Franks, and A.A. Yayanos** (1997). "Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria." *Appl Environ Microbiol* **63**(5): 2105-8.
66. **DePamphilis, M.L. and J. Adler** (1971). "Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **105**(1): 384-95.
67. **Derby, H. and B. Hammer** (1931). "Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies of surface taint butter." *IOWA Agricultural Experiment Station Research Bulletin* **145**: 387-416.
68. **DeRosier, D.** (2006). "Bacterial flagellum: visualizing the complete machine in situ." *Curr Biol* **16**(21): R928-30.

69. Dichristina, T.J., R.G. Arnold, M.E. Lidstrom, and M.R. Hoffmann (1988). "Dissimilative Iron Reduction by the Marine Eubacterium *Alteromonas-Putrefaciens* Strain-200." *Water Sci Technol* **20**(11-12): 69-79.
70. Dingwall, A., W.Y. Zhuang, K. Quon, and L. Shapiro (1992). "Expression of an early gene in the flagellar regulatory hierarchy is sensitive to an interruption in DNA replication." *J Bacteriol* **174**(6): 1760-8.
71. Dohlich, K. (2009). "Flagellare Untereinheiten des Filaments aus *Shewanella oneidensis* MR-1." *Diplomarbeit*.
72. Dong, H.L., J.K. Fredrickson, D.W. Kennedy, J.M. Zachara, R.K. Kukkadapu, and T.C. Onstott (2000). "Mineral transformation associated with the microbial reduction of magnetite." *Chemical Geology* **169**(3-4): 299-318.
73. Doyle, T.B., A.C. Hawkins, and L.L. McCarter (2004). "The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **186**(19): 6341-50.
74. Driks, A., R. Bryan, L. Shapiro, and D.J. DeRosier (1989). "The organization of the *Caulobacter crescentus* flagellar filament." *J Mol Biol* **206**(4): 627-36.
75. Duke, T.A., N. Le Novere, and D. Bray (2001). "Conformational spread in a ring of proteins: a stochastic approach to allostery." *J Mol Biol* **308**(3): 541-53.
76. Dyer, C.M., A.S. Vartanian, H. Zhou, and F.W. Dahlquist (2009). "A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching." *J Mol Biol* **388**(1): 71-84.
77. Ely, B., T.W. Ely, W.B. Crymes, Jr., and S.A. Minnich (2000). "A family of six flagellin genes contributes to the *Caulobacter crescentus* flagellar filament." *J Bacteriol* **182**(17): 5001-4.
78. Ewing, C.P., E. Andreishcheva, and P. Guerry (2009). "Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81-176." *J Bacteriol* **191**(22): 7086-93.
79. Farrenkopf, A.M., M.E. Dollhopf, S. NiChadhain, G.W. Luther, and K.H. Nealson (1997). "Reduction of iodate in seawater during Arabian Sea shipboard incubations and in laboratory cultures of the marine bacterium *Shewanella putrefaciens* strain MR-4." *Marine Chemistry* **57**(3-4): 347-354.
80. Faulds-Pain, A., C. Birchall, C. Aldridge, W.D. Smith, G. Grimaldi, S. Nakamura, T. Miyata, J. Gray, G. Li, J.X. Tang, K. Namba, T. Minamino, and P.D. Aldridge (2011). "Flagellin redundancy in *Caulobacter crescentus* and its implications for flagellar filament assembly." *J Bacteriol* **193**(11): 2695-707.
81. Fenchel, T. and R. Thar (2004). ""*Candidatus* Ovobacter propellens": a large conspicuous prokaryote with an unusual motility behaviour." *FEMS Microbiol Ecol* **48**(2): 231-8.
82. Francis, N.R., G.E. Sosinsky, D. Thomas, and D.J. DeRosier (1994). "Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex." *J Mol Biol* **235**(4): 1261-70.
83. Fredrickson, J.K., J.M. Zachara, D.W. Kennedy, H.L. Dong, T.C. Onstott, N.W. Hinman, and S.M. Li (1998). "Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **62**(19-20): 3239-3257.
84. Fuerst, J.A. and J.W. Perry (1988). "Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of *Vibrio cholerae* O:1 by protein A-gold immunoelectron microscopy." *J Bacteriol* **170**(4): 1488-94.
85. Fujita, H., S. Yamaguchi, T. Taira, and T. Iino (1981). "A simple method for the isolation of flagellar shape mutants in *Salmonella*." *J Gen Microbiol* **125**(1): 213-6.
86. Fukuoka, H., Y. Inoue, S. Terasawa, H. Takahashi, and A. Ishijima (2010). "Exchange of rotor components in functioning bacterial flagellar motor." *Biochem Biophys Res Commun* **394**(1): 130-5.
87. Gao, H., A. Obraztova, N. Stewart, R. Popa, J.K. Fredrickson, J.M. Tiedje, K.H. Nealson, and J. Zhou (2006). "*Shewanella loihica* sp. nov., isolated from iron-rich microbial mats in the Pacific Ocean." *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 8): 1911-6.
88. Garrity, L.F. and G.W. Ordal (1997). "Activation of the CheA kinase by asparagine in *Bacillus subtilis* chemotaxis." *Microbiology* **143**(Pt 9): 2945-51.
89. Gavin, R., A.A. Rabaan, S. Merino, J.M. Tomas, I. Gryllos, and J.G. Shaw (2002). "Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation." *Mol Microbiol* **43**(2): 383-97.
90. Gescher, J.S., C.D. Cordova, and A.M. Spormann (2008). "Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases." *Mol Microbiol* **68**(3): 706-19.
91. Gillen, K.L. and K.T. Hughes (1991). "Molecular characterization of *flgM*, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **173**(20): 6453-9.
92. Gode-Potratz, C.J., R.J. Kustusch, P.J. Breheny, D.S. Weiss, and L.L. McCarter (2011). "Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence." *Mol Microbiol* **79**(1): 240-63.
93. Godeke, J., M. Heun, S. Bubendorfer, K. Paul, and K.M. Thormann (2011). "Roles of two *Shewanella oneidensis* MR-1 extracellular endonucleases." *Appl Environ Microbiol* **77**(15): 5342-51.
94. Goldman, J.P., M.D. Levin, and D. Bray (2009). "Signal amplification in a lattice of coupled protein kinases." *Mol Biosyst* **5**(12): 1853-9.
95. Gomes, S.L. and L. Shapiro (1984). "Differential expression and positioning of chemotaxis methylation proteins in *Caulobacter*." *J Mol Biol* **178**(3): 551-68.
96. González, Y., D. Venegas, G. Mendoza-Hernandez, L. Camarena, and G. Dreyfus (2010). "Na(+)- and H(+)-dependent motility in the coral pathogen *Vibrio shilonii*." *FEMS Microbiol Lett* **312**(2): 142-50.
97. Gonzalez-Pedrajo, B., T. Minamino, M. Kihara, and K. Namba (2006). "Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export." *Mol Microbiol* **60**(4): 984-98.
98. Goon, S., J.F. Kelly, S.M. Logan, C.P. Ewing, and P. Guerry (2003). "Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene." *Mol Microbiol* **50**(2): 659-71.
99. Goto, T., S. Masuda, K. Terada, and Y. Takano (2001). "Comparison between observation and boundary element analysis of bacterium swimming motion." *JSME Int J C* **44**(4): 958-963.
100. Guerry, P. (2007). "*Campylobacter* flagella: not just for motility." *Trends Microbiol* **15**(10): 456-61.
101. Guerry, P., P. Doig, R.A. Alm, D.H. Burr, N. Kinsella, and T.J. Trust (1996). "Identification and characterization of genes required for post-translational modification of *Campylobacter coli* VC167 flagellin." *Mol Microbiol* **19**(2): 369-78.

102. **Guerry, P., C.P. Ewing, M. Schirm, M. Lorenzo, J. Kelly, D. Pattarini, G. Majam, P. Thibault, and S. Logan** (2006). "Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence." *Mol Microbiol* **60**(2): 299-311.
103. **Guttenplan, S.B., K.M. Blair, and D.B. Kearns** (2010). "The EpsE flagellar clutch is bifunctional and synergizes with EPS biosynthesis to promote *Bacillus subtilis* biofilm formation." *PLoS Genet* **6**(12): e1001243.
104. **Guttenplan, S.B., S. Shaw, and D.B. Kearns** (2013). "The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **87**(1): 211-29.
105. **Hadden, C. and E.W. Nester** (1968). "Purification of competent cells in the *Bacillus subtilis* transformation system." *J Bacteriol* **95**(3): 876-85.
106. **Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
107. **Harshey, R.M.** (2003). "Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal." *Annu Rev Microbiol* **57**: 249-73.
108. **Harshey, R.M. and T. Matsuyama** (1994). "Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8631-5.
109. **Hasegawa, K., I. Yamashita, and K. Namba** (1998). "Quasi- and nonequivalence in the structure of bacterial flagellar filament." *Biophys J* **74**(1): 569-75.
110. **Hau, H.H. and J.A. Gralnick** (2007). "Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*." *Annu Rev Microbiol* **61**: 237-58.
111. **Hazelbauer, G.L., J.J. Falke, and J.S. Parkinson** (2008). "Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays." *Trends Biochem Sci* **33**(1): 9-19.
112. **Hazelbauer, G.L. and W.C. Lai** (2010). "Bacterial chemoreceptors: providing enhanced features to two-component signaling." *Curr Opin Microbiol* **13**(2): 124-32.
113. **Heidelberg, J.F., I.T. Paulsen, K.E. Nelson, E.J. Gaidos, W.C. Nelson, T.D. Read, J.A. Eisen, R. Seshadri, N. Ward, B. Methe, R.A. Clayton, T. Meyer, A. Tsapin, J. Scott, M. Beanan, L. Brinkac, S. Daugherty, R.T. DeBoy, R.J. Dodson, A.S. Durkin, D.H. Haft, J.F. Kolonay, R. Madupu, J.D. Peterson, L.A. Umayam, O. White, A.M. Wolf, J. Vamathevan, J. Weidman, M. Impraim, K. Lee, K. Berry, C. Lee, J. Mueller, H. Khouri, J. Gill, T.R. Utterback, L.A. McDonald, T.V. Feldblyum, H.O. Smith, J.C. Venter, K.H. Neilson, and C.M. Fraser** (2002). "Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*." *Nat Biotechnol* **20**(11): 1118-23.
114. **Heimbrook, M.E., W.L. Wang, and G. Campbell** (1989). "Staining bacterial flagella easily." *J Clin Microbiol* **27**(11): 2612-5.
115. **Hickman, J.W., D.F. Tifrea, and C.S. Harwood** (2005). "A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14422-7.
116. **Hirota, K., Y. Nodasaka, Y. Orikasa, H. Okuyama, and I. Yumoto** (2005). "*Shewanella pneumatophori* sp. nov., an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium isolated from the intestines of Pacific mackerel (*Pneumatophorus japonicus*)." *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 6): 2355-9.
117. **Hirota, N. and Y. Imae** (1983). "Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1." *J Biol Chem* **258**(17): 10577-81.
118. **Hoch, J.A.** (2000). "Two-component and phosphorelay signal transduction." *Curr Opin Microbiol* **3**(2): 165-70.
119. **Holt, H.M., B. Gahrn-Hansen, and B. Bruun** (2005). "*Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics." *Clin Microbiol Infect* **11**(5): 347-52.
120. **Huang, J., B. Sun, and X. Zhang** (2010). "*Shewanella xiamenensis* sp. nov., isolated from coastal sea sediment." *Int J Syst Evol Microbiol* **60**(Pt 7): 1585-9.
121. **Hughes, K.T., K.L. Gillen, M.J. Semon, and J.E. Karlinsey** (1993). "Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator." *Science* **262**(5137): 1277-80.
122. **Hunt, T.P. and B. Magasanik** (1985). "Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(24): 8453-7.
123. **Icopini, G.A., J.G. Lack, L.E. Hersman, M.P. Neu, and H. Boukhalfa** (2009). "Plutonium(V/VI) Reduction by the Metal-Reducing Bacteria *Geobacter metallireducens* GS-15 and *Shewanella oneidensis* MR-1." *Appl Environ Microbiol* **75**(11): 3641-3647.
124. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama** (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
125. **Irikura, V.M., M. Kihara, S. Yamaguchi, H. Sockett, and R.M. Macnab** (1993). "*Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor." *J Bacteriol* **175**(3): 802-10.
126. **Ito, M., D.B. Hicks, T.M. Henkin, A.A. Guffanti, B.D. Powers, L. Zvi, K. Uematsu, and T.A. Krulwich** (2004). "MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic *Bacillus*, and its homologue is a second functional Mot in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **53**(4): 1035-49.
127. **Ito, M., N. Terahara, S. Fujinami, and T.A. Krulwich** (2005). "Properties of motility in *Bacillus subtilis* powered by the H⁺-coupled MotAB flagellar stator, Na⁺-coupled MotPS or hybrid stators MotAS or MotPB." *J Mol Biol* **352**(2): 396-408.
128. **Ivanova, E.P., S. Flavier, and R. Christen** (2004). "Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 5): 1773-88.
129. **Ivanova, E.P., N.M. Gorshkova, J.P. Bowman, A.M. Lyenko, N.V. Zhukova, A.F. Sergeev, V.V. Mikhailov, and D.V. Nicolau** (2004). "*Shewanella pacifica* sp. nov., a polyunsaturated fatty acid-producing bacterium isolated from sea water." *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 4): 1083-7.
130. **Ivanova, E.P., O.I. Nedashkovskaya, T. Sawabe, N.V. Zhukova, G.M. Frolova, D.V. Nicolau, V.V. Mikhailov, and J.P. Bowman** (2004). "*Shewanella affinis* sp. nov., isolated from marine invertebrates." *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 4): 1089-93.
131. **Ivanova, E.P., O.I. Nedashkovskaya, N.V. Zhukova, D.V. Nicolau, R. Christen, and V.V. Mikhailov** (2003). "*Shewanella waksmanii* sp. nov., isolated from a sipuncula (*Phascolosoma japonicum*)." *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(Pt 5): 1471-7.
132. **Ivanova, E.P., T. Sawabe, N.M. Gorshkova, V.I. Svetashev, V.V. Mikhailov, D.V. Nicolau, and R. Christen** (2001). "*Shewanella japonica* sp. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt 3): 1027-33.

133. Ivanova, E.P., T. Sawabe, K. Hayashi, N.M. Gorshkova, N.V. Zhukova, O.I. Nedashkovskaya, V.V. Mikhailov, D.V. Nicolau, and R. Christen (2003). "*Shewanella fidelis* sp. nov., isolated from sediments and sea water." *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(Pt 2): 577-82.
134. Jarrell, K.F., D.P. Bayley, and A.S. Kostyukova (1996). "The archaeal flagellum: a unique motility structure." *J Bacteriol* **178**(17): 5057-64.
135. Jarrell, K.F., L. Craig, M. Koomey, E. Milgotina, M. Donneberg, H. Remaut, G. Waksman, A. Mandlik, A. Gaspar, A. Swaminathan, A. Mishra, A. Das, H. Ton-That, S. Aizawa, J. Brown, A. Faulds-Pain, P. Aldridge, D.F. Blair, F.A. Samatey, S.M. Logan, S. Merino, J.M. Tomas, K. Majander, L. Anton, R. Kylväjä, B. Westerlund-Wikström, R. Liu, D.J. VanDyke, and J. Wu (2009). "Pili and Flagella - Current Research and Future Trends." Pili and Flagella - Current Research and Future Trends. ed. K.F. Jarrell. Norfolk, UK: *Caister Academic Press*.
136. Jarrell, K.F. and M.J. McBride (2008). "The surprisingly diverse ways that prokaryotes move." *Nat Rev Microbiol* **6**(6): 466-76.
137. Jenal, U. and J. Malone (2006). "Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria." *Annu Rev Genet* **40**: 385-407.
138. Jiang, Z.Y., B.G. Rushing, Y. Bai, H. Gest, and C.E. Bauer (1998). "Isolation of Rhodospirillum centenum mutants defective in phototactic colony motility by transposon mutagenesis." *J Bacteriol* **180**(5): 1248-55.
139. Johansen, J.E., J. Pinhassi, N. Blackburn, U.L. Zweifel, and A. Hagstrom (2002). "Variability in motility characteristics among marine bacteria." *Aquat Microb Ecol* **28**(3): 229-237.
140. Johnson, R.C., D.M. Ferber, and B. Ely (1983). "Synthesis and assembly of flagellar components by *Caulobacter crescentus* motility mutants." *J Bacteriol* **154**(3): 1137-44.
141. Josenhans, C., R.L. Ferrero, A. Labigne, and S. Suerbaum (1999). "Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes of *Helicobacter felis*." *Mol Microbiol* **33**(2): 350-62.
142. Josenhans, C. and S. Suerbaum (2002). "The role of motility as a virulence factor in bacteria." *Int J Med Microbiol* **291**(8): 605-14.
143. Kamiya, R., S. Asakura, and S. Yamaguchi (1980). "Formation of helical filaments by copolymerization of two types of 'straight' flagellins." *Nature* **286**(5773): 628-30.
144. Kanbe, M., J. Yagasaki, S. Zehner, M. Gottfert, and S. Aizawa (2007). "Characterization of two sets of subpolar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*." *J Bacteriol* **189**(3): 1083-9.
145. Kawagishi, I., M. Imagawa, Y. Imae, L. McCarter, and M. Homma (1996). "The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression." *Mol Microbiol* **20**(4): 693-9.
146. Kawagishi, I., Y. Maekawa, T. Atsumi, M. Homma, and Y. Imae (1995). "Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources." *J Bacteriol* **177**(17): 5158-60.
147. Kearns, D.B. (2010). "A field guide to bacterial swarming motility." *Nat Rev Microbiol* **8**(9): 634-44.
148. Kelley, L.A. and M.J. Sternberg (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." *Nat Protoc* **4**(3): 363-71.
149. Kentner, D. and V. Sourjik (2006). "Spatial organization of the bacterial chemotaxis system." *Curr Opin Microbiol* **9**(6): 619-24.
150. Khan, I.H., T.S. Reese, and S. Khan (1992). "The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 5956-60.
151. Khan, S., M. Dapice, and T.S. Reese (1988). "Effects of *mot* gene expression on the structure of the flagellar motor." *J Mol Biol* **202**(3): 575-84.
152. Kim, D., K.S. Baik, M.S. Kim, B.M. Jung, T.S. Shin, G.H. Chung, M.S. Rhee, and C.N. Seong (2007). "*Shewanella haliotis* sp. nov., isolated from the gut microflora of abalone, *Haliotis discus hannai*." *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(Pt 12): 2926-31.
153. Kim, K.K., Y.O. Kim, S. Park, S.J. Kang, B.H. Nam, D.N. Kim, T.K. Oh, and J.H. Yoon (2011). "*Shewanella upenei* sp. nov., a lipolytic bacterium isolated from *bensasi* goatfish *Upeneus bensasi*." *J Microbiol* **49**(3): 381-6.
154. Kim, S.J., S.J. Park, Y.S. Oh, S.A. Lee, K.S. Shin, D.H. Roh, and S.K. Rhee (2012). "*Shewanella arctica* sp. nov., an iron-reducing bacterium isolated from Arctic marine sediment." *Int J Syst Evol Microbiol* **62**(Pt 5): 1128-33.
155. Kim, Y.K. and L.L. McCarter (2000). "Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*." *J Bacteriol* **182**(13): 3693-704.
156. Kim, Y.K. and L.L. McCarter (2004). "Cross-regulation in *Vibrio parahaemolyticus*: compensatory activation of polar flagellar genes by the lateral flagellar regulator LafK." *J Bacteriol* **186**(12): 4014-8.
157. Kimura, K., S. Tateiri, and H. Iida (1979). "Effects of pH of the medium on flagellation of *Vibrio parahaemolyticus*." *Appl Environ Microbiol* **37**(6): 1248-9.
158. Kirov, S.M. (2003). "Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis." *FEMS Microbiol Lett* **224**(2): 151-9.
159. Kirov, S.M., M. Castrisios, and J.G. Shaw (2004). "*Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces." *Infect Immun* **72**(4): 1939-45.
160. Kirov, S.M., B.C. Tassell, A.B. Semmler, L.A. O'Donovan, A.A. Rabaan, and J.G. Shaw (2002). "Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species." *J Bacteriol* **184**(2): 547-55.
161. Klonowska, A., T. Heulin, and A. Vermeglio (2005). "Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*." *Appl Environ Microbiol* **71**(9): 5607-5609.
162. Klose, K.E. and J.J. Mekalanos (1998). "Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*." *J Bacteriol* **180**(2): 303-16.
163. Koerdt, A., A. Paulick, M. Mock, K. Jost, and K.M. Thormann (2009). "MotX and MotY are required for flagellar rotation in *Shewanella oneidensis* MR-1." *J Bacteriol* **191**(16): 5085-93.
164. Kojima, M., R. Kubo, T. Yakushi, M. Homma, and I. Kawagishi (2007). "The bidirectional polar and unidirectional lateral flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* are controlled by a single CheY species." *Mol Microbiol* **64**(1): 57-67.
165. Kojima, S., K. Yamamoto, I. Kawagishi, and M. Homma (1999). "The polar flagellar motor of *Vibrio cholerae* is driven by an Na⁺ motive force." *J Bacteriol* **181**(6): 1927-30.

166. **Kondoh, H. and M. Yanagida** (1975). "Structure of straight flagellar filaments from a mutant of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **96**(4): 641-52.
167. **Konkel, M.E., B.J. Kim, V. Rivera-Amill, and S.G. Garvis** (1999). "Identification of proteins required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells." *Adv Exp Med Biol* **473**: 215-24.
168. **Konkel, M.E., J.D. Klena, V. Rivera-Amill, M.R. Monteville, D. Biswas, B. Raphael, and J. Mickelson** (2004). "Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus." *J Bacteriol* **186**(11): 3296-303.
169. **Korobkova, E., T. Emonet, J.M. Vilar, T.S. Shimizu, and P. Cluzel** (2004). "From molecular noise to behavioural variability in a single bacterium." *Nature* **428**(6982): 574-8.
170. **Kostka, J.E., G.W. Luther, and K.H. Nealson** (1995). "Chemical and Biological Reduction of Mn(III)-Pyrophosphate Complexes - Potential Importance of Dissolved Mn(III) as an Environmental Oxidant." *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **59**(5): 885-894.
171. **Kostka, J.E. and K.H. Nealson** (1995). "Dissolution and reduction of magnetite by bacteria." *Environ Sci Technol* **29**(10): 2535-40.
172. **Kovach, M.E., P.H. Elzer, D.S. Hill, G.T. Robertson, M.A. Farris, R.M. Roop, and K.M. Peterson** (1995). "4 New Derivatives of the Broad-Host-Range Cloning Vector Pbb1mcs, Carrying Different Antibiotic-Resistance Cassettes." *Gene* **166**(1): 175-176.
173. **Kuchma, S.L., K.M. Brothers, J.H. Merritt, N.T. Liberati, F.M. Ausubel, and G.A. O'Toole** (2007). "BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14." *J Bacteriol* **189**(22): 8165-78.
174. **Kulakova, L., A. Galkin, T. Kurihara, T. Yoshimura, and N. Esaki** (1999). "Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization." *Appl Environ Microbiol* **65**(2): 611-7.
175. **Kutsukake, K., Y. Ohya, and T. Iino** (1990). "Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **172**(2): 741-7.
176. **Laemmli, U.K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
177. **Larsen, I., B. Little, K.H. Nealson, R. Ray, A. Stone, and J.H. Tian** (1998). "Manganite reduction by *Shewanella putrefaciens* MR-4." *American Mineralogist* **83**(11-12): 1564-1572.
178. **Lassak, J., A.L. Henche, L. Binnenkade, and K.M. Thormann** (2010). "ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1." *Appl Environ Microbiol* **76**(10): 3263-74.
179. **Lauga, E., W.R. DiLuzio, G.M. Whitesides, and H.A. Stone** (2006). "Swimming in circles: motion of bacteria near solid boundaries." *Biophys J* **90**(2): 400-12.
180. **Leake, M.C., J.H. Chandler, G.H. Wadhams, F. Bai, R.M. Berry, and J.P. Armitage** (2006). "Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes." *Nature* **443**(7109): 355-8.
181. **Lee, J.V., D.M. Gibson, and J.M. Shewan** (1977). "A Numerical Taxonomic Study of Some *Pseudomonas*-like Marine Bacteria." *Journal of General Microbiology* **98**(2): 439-451.
182. **Lee, M.H. and J.H. Yoon** (2012). "*Shewanella litorisediminis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from a tidal flat sediment." *Antonie Van Leeuwenhoek* **102**(4): 591-9.
183. **Lee, O.O., S.C. Lau, M.M. Tsoi, X. Li, I. Plakhotnikova, S. Dobretsov, M.C. Wu, P.K. Wong, M. Weinbauer, and P.Y. Qian** (2006). "*Shewanella irciniae* sp. nov., a novel member of the family *Shewanellaceae*, isolated from the marine sponge *Ircinia dendroides* in the Bay of Villefranche, Mediterranean Sea." *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 12): 2871-7.
184. **Lee, S.Y., H.S. Cho, J.G. Pelton, D. Yan, R.K. Henderson, D.S. King, L. Huang, S. Kustu, E.A. Berry, and D.E. Wemmer** (2001). "Crystal structure of an activated response regulator bound to its target." *Nat Struct Biol* **8**(1): 52-6.
185. **Leonardo, M.R., D.P. Moser, E. Barbieri, C.A. Brantner, B.J. MacGregor, B.J. Paster, E. Stackebrandt, and K.H. Nealson** (1999). "*Shewanella pealeana* sp. nov., a member of the microbial community associated with the accessory nidamental gland of the squid *Loligo pealei*." *Int J Syst Bacteriol* **49** Pt 4: 1341-51.
186. **Letunic, I. and P. Bork** (2007). "Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation." *Bioinformatics* **23**(1): 127-8.
187. **Li, C., L. Corum, D. Morgan, E.L. Rosey, T.B. Stanton, and N.W. Charon** (2000). "The spirochete FlaA periplasmic flagellar sheath protein impacts flagellar helicity." *J Bacteriol* **182**(23): 6698-706.
188. **Li, C., M. Sal, M. Marko, and N.W. Charon** (2010). "Differential regulation of the multiple flagellins in spirochetes." *J Bacteriol* **192**(10): 2596-603.
189. **Li, G., L.K. Tam, and J.X. Tang** (2008). "Amplified effect of Brownian motion in bacterial near-surface swimming." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18355-9.
190. **Li, H. and V. Sourjik** (2011). "Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **80**(4): 886-99.
191. **Li, J., M.F. Romine, and M.J. Ward** (2007). "Identification and analysis of a highly conserved chemotaxis gene cluster in *Shewanella* species." *FEMS Microbiol Lett* **273**(2): 180-6.
192. **Linton, D., M. Gilbert, P.G. Hitchen, A. Dell, H.R. Morris, W.W. Wakarchuk, N.A. Gregson, and B.W. Wren** (2000). "Phase variation of a beta-1,3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipooligosaccharide of *Campylobacter jejuni*." *Mol Microbiol* **37**(3): 501-14.
193. **Liu, F. and M.E. Tanner** (2006). "PseG of pseudaminic acid biosynthesis: a UDP-sugar hydrolase as a masked glycosyltransferase." *J Biol Chem* **281**(30): 20902-9.
194. **Liu, R. and H. Ochman** (2007). "Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems." *J Bacteriol* **189**(19): 7098-104.
195. **Liu, R. and H. Ochman** (2007). "Stepwise formation of the bacterial flagellar system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(17): 7116-21.
196. **Lloyd, J.R., P. Yong, and L.E. Macaskie** (2000). "Biological reduction and removal of Np(V) by two microorganisms." *Environ Sci Technol* **34**(7): 1297-1301.
197. **Lloyd, S.A. and D.F. Blair** (1997). "Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **266**(4): 733-44.

198. **Lloyd, S.A., H. Tang, X. Wang, S. Billings, and D.F. Blair** (1996). "Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FlIG but not for FlIM or FlIN." *J Bacteriol* **178**(1): 223-31.
199. **Locsei, J.T. and T.J. Pedley** (2009). "Bacterial tracking of motile algae assisted by algal cell's vorticity field." *Microb Ecol* **58**(1): 63-74.
200. **Logan, S.M.** (2006). "Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire?" *Microbiology* **152**(Pt 5): 1249-62.
201. **Logan, S.M., J.P. Hui, E. Vinogradov, A.J. Aubry, J.E. Melanson, J.F. Kelly, H. Nothaft, and E.C. Soo** (2009). "Identification of novel carbohydrate modifications on *Campylobacter jejuni* 11168 flagellin using metabolomics-based approaches." *FEBS J* **276**(4): 1014-23.
202. **Logan, S.M., J.F. Kelly, P. Thibault, C.P. Ewing, and P. Guerry** (2002). "Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins." *Mol Microbiol* **46**(2): 587-97.
203. **Logan, S.M., I.C. Schoenhofen, and P. Guerry** (2008). "O-Linked flagellar glycosylation in *Campylobacter*." *Campylobacter* 3rd ed., ed. I. Nachamkin, C.M. Szymanski, and M.J. Blaser. Washington, DC: ASM Press. 471-81.
204. **Lonetto, M., M. Gribskov, and C.A. Gross** (1992). "The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships." *J Bacteriol* **174**(12): 3843-9.
205. **Long, H. and B. Hammer** (1941). "Classification of organisms important in dairy products. III. *Pseudomonas putrefaciens*." *IOWA Agricultural Experiment Station Research Bulletin* **285**: 176-195.
206. **Lowder, B.J., M.D. Duyvesteyn, and D.F. Blair** (2005). "FlIG subunit arrangement in the flagellar rotor probed by targeted cross-linking." *J Bacteriol* **187**(16): 5640-7.
207. **Lozada-Chavez, I., S.C. Janga, and J. Collado-Vides** (2006). "Bacterial regulatory networks are extremely flexible in evolution." *Nucleic Acids Res* **34**(12): 3434-45.
208. **Luke, C.J. and C.W. Penn** (1995). "Identification of a 29 kDa flagellar sheath protein in *Helicobacter pylori* using a murine monoclonal antibody." *Microbiology* **141** (Pt 3): 597-604.
209. **MacDonell, M. and R. Colwell** (1985). "Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*." *Syst Appl Microbiol* **6**: 171-182.
210. **Madan Babu, M., S.A. Teichmann, and L. Aravind** (2006). "Evolutionary dynamics of prokaryotic transcriptional regulatory networks." *J Mol Biol* **358**(2): 614-33.
211. **Maddock, J.R. and L. Shapiro** (1993). "Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell." *Science* **259**(5102): 1717-23.
212. **Madi, L., M. Kessel, E. Sadovnik, and Y. Henis** (1988). "Electron-Microscopic Studies of Aggregation and Pellicle Formation in *Azospirillum* Spp." *Plant Soil* **109**(1): 115-121.
213. **Maezawa, K., S. Shigenobu, H. Taniguchi, T. Kubo, S. Aizawa, and M. Morioka** (2006). "Hundreds of flagellar basal bodies cover the cell surface of the endosymbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* sp. strain APS." *J Bacteriol* **188**(18): 6539-43.
214. **Magariyama, Y., M. Ichiba, K. Nakata, K. Baba, T. Ohtani, S. Kudo, and T. Goto** (2005). "Difference in bacterial motion between forward and backward swimming caused by the wall effect." *Biophys J* **88**(5): 3648-58.
215. **Magariyama, Y., S. Sugiyama, K. Muramoto, Y. Maekawa, I. Kawagishi, Y. Imae, and S. Kudo** (1994). "Very fast flagellar rotation." *Nature* **371**(6500): 752.
216. **Mahajan, A., C.G. Currie, S. Mackie, J. Tree, S. McAteer, I. McKendrick, T.N. McNeilly, A. Roe, R.M. La Ragione, M.J. Woodward, D.L. Gally, and D.G. Smith** (2009). "An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157 : H7 with bovine intestinal epithelium." *Cell Microbiol* **11**(1): 121-37.
217. **Makemson, J.C., N.R. Fulayfil, W. Landry, L.M. Van Ert, C.F. Wimpee, E.A. Widder, and J.F. Case** (1997). "*Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea." *Int J Syst Bacteriol* **47**(4): 1034-9.
218. **Mathews, M.A., H.L. Tang, and D.F. Blair** (1998). "Domain analysis of the FlIM protein of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **180**(21): 5580-90.
219. **McCarter, L., M. Hilmen, and M. Silverman** (1988). "Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*." *Cell* **54**(3): 345-51.
220. **McCarter, L. and M. Silverman** (1989). "Iron regulation of swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*." *J Bacteriol* **171**(2): 731-6.
221. **McCarter, L. and M. Silverman** (1990). "Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*." *Mol Microbiol* **4**(7): 1057-62.
222. **McCarter, L.L.** (1994). "MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor." *J Bacteriol* **176**(19): 5988-98.
223. **McCarter, L.L.** (1994). "MotY, a component of the sodium-type flagellar motor." *J Bacteriol* **176**(14): 4219-25.
224. **McCarter, L.L.** (2001). "Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*." *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(3): 445-62, table of contents.
225. **McCarter, L.L.** (2004). "Dual flagellar systems enable motility under different circumstances." *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**(1-2): 18-29.
226. **McCarter, L.L.** (2006). "Regulation of flagella." *Curr Opin Microbiol* **9**(2): 180-6.
227. **McClain, J., D.R. Rollo, B.G. Rushing, and C.E. Bauer** (2002). "*Rhodospirillum centenum* utilizes separate motor and switch components to control lateral and polar flagellum rotation." *J Bacteriol* **184**(9): 2429-38.
228. **McMurry, J.L., J.W. Murphy, and B. Gonzalez-Pedrajo** (2006). "The FlIN-FlIH interaction mediates localization of flagellar export ATPase Flil to the C ring complex." *Biochemistry* **45**(39): 11790-8.
229. **McNally, D.J., A.J. Aubry, J.P. Hui, N.H. Khieu, D. Whitfield, C.P. Ewing, P. Guerry, J.R. Brisson, S.M. Logan, and E.C. Soo** (2007). "Targeted metabolomics analysis of *Campylobacter coli* VC167 reveals legionaminic acid derivatives as novel flagellar glycans." *J Biol Chem* **282**(19): 14463-75.
230. **McNally, D.J., J.P. Hui, A.J. Aubry, K.K. Mui, P. Guerry, J.R. Brisson, S.M. Logan, and E.C. Soo** (2006). "Functional characterization of the flagellar glycosylation locus in *Campylobacter jejuni* 81-176 using a focused metabolomics approach." *J Biol Chem* **281**(27): 18489-98.
231. **Merino, S., J.G. Shaw, and J.M. Tomas** (2006). "Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system." *FEMS Microbiol Lett* **263**(2): 127-35.

232. **Miller, V.L. and J.J. Mekalanos** (1988). "A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*." *J Bacteriol* **170**(6): 2575-83.
233. **Minamino, T., K. Imada, and K. Namba** (2008). "Molecular motors of the bacterial flagella." *Curr Opin Struct Biol* **18**(6): 693-701.
234. **Minamino, T. and R.M. Macnab** (2000). "Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching." *J Bacteriol* **182**(17): 4906-14.
235. **Mitchell, J.G., L. Pearson, and S. Dillon** (1996). "Clustering of marine bacteria in seawater enrichments." *Appl Environ Microbiol* **62**(10): 3716-21.
236. **Miyata, M.** (2008). "Centipede and inchworm models to explain *Mycoplasma* gliding." *Trends Microbiol* **16**(1): 6-12.
237. **Miyazaki, M., Y. Nogi, R. Usami, and K. Horikoshi** (2006). "*Shewanella surugensis* sp. nov., *Shewanella kaireitica* sp. nov. and *Shewanella abyssi* sp. nov., isolated from deep-sea sediments of Suruga Bay, Japan." *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 7): 1607-13.
238. **Moens, S., K. Michiels, V. Keijers, F. Van Leuven, and J. Vanderleyden** (1995). "Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7." *J Bacteriol* **177**(19): 5419-26.
239. **Moens, S., M. Schloter, and J. Vanderleyden** (1996). "Expression of the structural gene, *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella in *Azospirillum brasilense* Sp7." *J Bacteriol* **178**(16): 5017-9.
240. **Molero, R., M. Wilhelms, B. Infanzon, J.M. Tomas, and S. Merino** (2011). "*Aeromonas hydrophila* *motY* is essential for polar flagellum function, and requires coordinate expression of *motX* and Pom proteins." *Microbiology* **157**(Pt 10): 2772-84.
241. **Morett, E. and M. Buck** (1989). "In vivo studies on the interaction of RNA polymerase-sigma 54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* *nifH* promoters. The role of NifA in the formation of an open promoter complex." *J Mol Biol* **210**(1): 65-77.
242. **Morett, E. and L. Segovia** (1993). "The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains." *J Bacteriol* **175**(19): 6067-74.
243. **Muir, R.E. and J.W. Gober** (2001). "Regulation of late flagellar gene transcription and cell division by flagellum assembly in *Caulobacter crescentus*." *Mol Microbiol* **41**(1): 117-30.
244. **Mukherjee, S., P. Babitzke, and D.B. Kearns** (2013). "FliW and FliS function independently to control cytoplasmic flagellin levels in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **195**(2): 297-306.
245. **Mukherjee, S., H. Yakhnin, D. Kysela, J. Sokoloski, P. Babitzke, and D.B. Kearns** (2011). "CsrA-FliW interaction governs flagellin homeostasis and a checkpoint on flagellar morphogenesis in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **82**(2): 447-61.
246. **Murray, A.E., D. Lies, G. Li, K. Nealson, J. Zhou, and J.M. Tiedje** (2001). "DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9853-8.
247. **Myers, C.R. and K.H. Nealson** (1988). "Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor." *Science* **240**(4857): 1319-21.
248. **Myers, C.R. and K.H. Nealson** (1990). "Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1." *J Bacteriol* **172**(11): 6232-8.
249. **Nathan, P., S.L. Gomes, K. Hahnenberger, A. Newton, and L. Shapiro** (1986). "Differential localization of membrane receptor chemotaxis proteins in the *Caulobacter* predivisional cell." *J Mol Biol* **191**(3): 433-40.
250. **Neal-McKinney, J.M., J.E. Christensen, and M.E. Konkel** (2010). "Amino-terminal residues dictate the export efficiency of the *Campylobacter jejuni* filament proteins via the flagellum." *Mol Microbiol* **76**(4): 918-31.
251. **Nealson, K.H., C.R. Myers, and B.B. Wimpsee** (1991). "Isolation and Identification of Manganese-Reducing Bacteria and Estimates of Microbial Mn(IV)-Reducing Potential in the Black-Sea." *Deep Sea Res A* **38**: S907-S920.
252. **Ng, S.Y., B. Chaban, and K.F. Jarrell** (2006). "Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications." *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**(3-5): 167-91.
253. **Nogi, Y., C. Kato, and K. Horikoshi** (1998). "Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov." *Arch Microbiol* **170**(5): 331-8.
254. **Novick, A. and M. Weiner** (1957). "Enzyme Induction as an All-or-None Phenomenon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **43**(7): 553-566.
255. **Obuekwe, C.O. and D.W. Westlake** (1982). "Effects of medium composition on cell pigmentation, cytochrome content, and ferric iron reduction in a *Pseudomonas* sp. isolated from crude oil." *Can J Microbiol* **28**(8): 989-92.
256. **Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki, and T. Iino** (1990). "Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*." *Mol Gen Genet* **221**(2): 139-47.
257. **Okabe, M., T. Yakushi, Y. Asai, and M. Homma** (2001). "Cloning and characterization of *motX*, a *Vibrio alginolyticus* sodium-driven flagellar motor gene." *J Biochem* **130**(6): 879-84.
258. **Okabe, M., T. Yakushi, and M. Homma** (2005). "Interactions of MotX with MotY and with the PomA/PomB sodium ion channel complex of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellum." *J Biol Chem* **280**(27): 25659-64.
259. **Okunishi, I., I. Kawagishi, and M. Homma** (1996). "Cloning and characterization of *motY*, a gene coding for a component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*." *J Bacteriol* **178**(8): 2409-15.
260. **Ottemann, K.M. and J.F. Miller** (1997). "Roles for motility in bacterial-host interactions." *Mol Microbiol* **24**(6): 1109-17.
261. **Pallen, M.J., C.M. Bailey, and S.A. Beatson** (2006). "Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases." *Protein Sci* **15**(4): 935-41.
262. **Park, S.C., K.S. Baik, M.S. Kim, D. Kim, and C.N. Seong** (2009). "*Shewanella marina* sp. nov., isolated from seawater." *Int J Syst Evol Microbiol* **59**(Pt 8): 1888-94.
263. **Parker, J.L., M.J. Day-Williams, J.M. Tomas, G.P. Stafford, and J.G. Shaw** (2012). "Identification of a putative glycosyltransferase responsible for the transfer of pseudaminic acid onto the polar flagellin of *Aeromonas caviae* Sch3N." *Microbiologyopen* **1**(2): 149-60.
264. **Parkinson, J.S.** (2010). "Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases." *Annu Rev Microbiol* **64**: 101-22.
265. **Parks, A.R. and J.E. Peters** (2007). "Transposon Tn7 is widespread in diverse bacteria and forms genomic islands." *J Bacteriol* **189**(5): 2170-3.

266. Patrick, J.E. and D.B. Kearns (2012). "Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis." *Mol Microbiol* **83**(1): 14-23.
267. Paul, K. and D.F. Blair (2006). "Organization of FlhN subunits in the flagellar motor of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **188**(7): 2502-11.
268. Paul, K., J.G. Harmon, and D.F. Blair (2006). "Mutational analysis of the flagellar rotor protein FlhN: identification of surfaces important for flagellar assembly and switching." *J Bacteriol* **188**(14): 5240-8.
269. Paulick, A. (2012). "Flagellar motor tuning: The hybrid motor in *Shewanella oneidensis* MR-1." *Doktorarbeit*.
270. Paulick, A., A. Koerdt, J. Lassak, S. Huntley, I. Wilms, F. Narberhaus, and K.M. Thormann (2009). "Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1." *Mol Microbiol* **71**(4): 836-50.
271. Pedelacq, J.D., S. Cabantous, T. Tran, T.C. Terwilliger, and G.S. Waldo (2006). "Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein." *Nat Biotechnol* **24**(1): 79-88.
272. Perry, K.A., J.E. Kostka, G.W. Luther, 3rd, and K.H. Nealson (1993). "Mediation of sulfur speciation by a black sea facultative anaerobe." *Science* **259**(5096): 801-3.
273. Pilizota, T., M.T. Brown, M.C. Leake, R.W. Branch, R.M. Berry, and J.P. Armitage (2009). "A molecular brake, not a clutch, stops the *Rhodobacter sphaeroides* flagellar motor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(28): 11582-7.
274. Ping, L., J. Birkenbeil, and S. Monajembashi (2013). "Swimming behavior of the monotrichous bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25." *FEMS Microbiol Ecol*.
275. Platzer, J., W. Sterr, M. Hausmann, and R. Schmitt (1997). "Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*." *J Bacteriol* **179**(20): 6391-9.
276. Poggio, S., C. Abreu-Goodger, S. Fabela, A. Osorio, G. Dreyfus, P. Vinuesa, and L. Camarena (2007). "A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*." *J Bacteriol* **189**(8): 3208-16.
277. Poly, F., C. Ewing, S. Goon, T.E. Hickey, D. Rockabrand, G. Majam, L. Lee, J. Phan, N.J. Savarino, and P. Guerry (2007). "Heterogeneity of a *Campylobacter jejuni* protein that is secreted through the flagellar filament." *Infect Immun* **75**(8): 3859-67.
278. Porter, S.L., G.H. Wadhams, and J.P. Armitage (2011). "Signal processing in complex chemotaxis pathways." *Nat Rev Microbiol* **9**(3): 153-65.
279. Pospiech, A. and B. Neumann (1995). "A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria." *Trends Genet* **11**(6): 217-8.
280. Power, M.E., P. Guerry, W.D. McCubbin, C.M. Kay, and T.J. Trust (1994). "Structural and antigenic characteristics of *Campylobacter coli* FlaA flagellin." *J Bacteriol* **176**(11): 3303-13.
281. Pratt, L.A. and R. Kolter (1998). "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." *Mol Microbiol* **30**(2): 285-93.
282. Prouty, M.G., N.E. Correa, and K.E. Klose (2001). "The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*." *Mol Microbiol* **39**(6): 1595-609.
283. Purcell, E.M. (1977). "Life at Low Reynolds-Number." *Am J Phys* **45**(1): 3-11.
284. Rabaan, A.A., I. Gryllos, J.M. Tomas, and J.G. Shaw (2001). "Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells." *Infect Immun* **69**(7): 4257-67.
285. Ragatz, L., Z.Y. Jiang, C.E. Bauer, and H. Gest (1995). "Macroscopic phototactic behavior of the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*." *Arch Microbiol* **163**(1): 1-6.
286. Ramia, M., D.L. Tullock, and N. Phan-Thien (1993). "The role of hydrodynamic interaction in the locomotion of microorganisms." *Biophys J* **65**(2): 755-78.
287. Reid, S.W., M.C. Leake, J.H. Chandler, C.J. Lo, J.P. Armitage, and R.M. Berry (2006). "The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(21): 8066-71.
288. Ren, C.P., S.A. Beatson, J. Parkhill, and M.J. Pallen (2005). "The Flag-2 locus, an ancestral gene cluster, is potentially associated with a novel flagellar system from *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **187**(4): 1430-40.
289. Rivera-Amill, V., B.J. Kim, J. Seshu, and M.E. Konkel (2001). "Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal." *J Infect Dis* **183**(11): 1607-16.
290. Roden, E.E. and J.M. Zachara (1996). "Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth." *Environ Sci Technol* **30**(5): 1618-1628.
291. Rodriguez-Navarro, D.N., M.S. Dardanelli, and J.E. Ruiz-Sainz (2007). "Attachment of bacteria to the roots of higher plants." *FEMS Microbiol Lett* **272**(2): 127-36.
292. Romling, U., M. Gomelsky, and M.Y. Galperin (2005). "C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system." *Mol Microbiol* **57**(3): 629-39.
293. Roy, K., G.M. Hilliard, D.J. Hamilton, J. Luo, M.M. Ostmann, and J.M. Fleckenstein (2009). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells." *Nature* **457**(7229): 594-8.
294. Saltikov, C.W., A. Cifuentes, K. Venkateswaran, and D.K. Newman (2003). "The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3." *Appl Environ Microbiol* **69**(5): 2800-9.
295. Samatey, F.A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, and K. Namba (2001). "Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling." *Nature* **410**(6826): 331-7.
296. Samatey, F.A., H. Matsunami, K. Imada, S. Nagashima, T.R. Shaikh, D.R. Thomas, J.Z. Chen, D.J. Derosier, A. Kitao, and K. Namba (2004). "Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism." *Nature* **431**(7012): 1062-8.
297. Sambrook, J. and D.W. Russell (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." third ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
298. Samuelsson, M.O. (1985). "Dissimilatory nitrate reduction to nitrate, nitrous oxide, and ammonium by *Pseudomonas putrefaciens*." *Appl Environ Microbiol* **50**(4): 812-5.
299. Sanders, D.A., B.L. Gillece-Castro, A.M. Stock, A.L. Burlingame, and D.E. Koshland, Jr. (1989). "Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY." *J Biol Chem* **264**(36): 21770-8.

300. Sar, N., L. McCarter, M. Simon, and M. Silverman (1990). "Chemotactic control of the two flagellar systems of *Vibrio parahaemolyticus*." *J Bacteriol* **172**(1): 334-41.
301. Sarkar, M.K., K. Paul, and D. Blair (2010). "Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(20): 9370-5.
302. Sato, K. and M. Homma (2000). "Multimeric structure of PomA, a component of the Na⁺-driven polar flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*." *J Biol Chem* **275**(26): 20223-8.
303. Satomi, M., H. Oikawa, and Y. Yano (2003). "*Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines." *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(Pt 2): 491-9.
304. Satomi, M., B.F. Vogel, L. Gram, and K. Venkateswaran (2006). "*Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea." *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 1): 243-9.
305. Satomi, M., B.F. Vogel, K. Venkateswaran, and L. Gram (2007). "Description of *Shewanella glacialis* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*." *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(Pt 2): 347-52.
306. Scharf, B.E., K.A. Fahrner, and H.C. Berg (1998). "CheZ has no effect on flagellar motors activated by CheY13DK106YW." *J Bacteriol* **180**(19): 5123-8.
307. Scheludko, A.V., E.I. Katsy, N.A. Ostudin, O.K. Gringauz, and V.I. Panasenko (1998). "Novel classes of *Azospirillum brasilense* mutants with defects in the assembly and functioning of polar and lateral flagella." *Mol Gen Mikrobiol Virusol*(4): 33-7.
308. Schirm, M., S.K. Arora, A. Verma, E. Vinogradov, P. Thibault, R. Ramphal, and S.M. Logan (2004). "Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **186**(9): 2523-31.
309. Schirm, M., M. Kalmokoff, A. Aubry, P. Thibault, M. Sandoz, and S.M. Logan (2004). "Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine." *J Bacteriol* **186**(20): 6721-7.
310. Schirm, M., I.C. Schoenhofen, S.M. Logan, K.C. Waldron, and P. Thibault (2005). "Identification of unusual bacterial glycosylation by tandem mass spectrometry analyses of intact proteins." *Anal Chem* **77**(23): 7774-82.
311. Schirm, M., E.C. Soo, A.J. Aubry, J. Austin, P. Thibault, and S.M. Logan (2003). "Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*." *Mol Microbiol* **48**(6): 1579-92.
312. Schoenhals, G.J., M. Kihara, and R.M. Macnab (1998). "Translation of the flagellar gene *fliO* of *Salmonella typhimurium* from putative tandem starts." *J Bacteriol* **180**(11): 2936-42.
313. Schoenhofen, I.C., V.V. Lunin, J.P. Julien, Y. Li, E. Ajamian, A. Matte, M. Cygler, J.R. Brisson, A. Aubry, S.M. Logan, S. Bhatia, W.W. Wakarchuk, and N.M. Young (2006). "Structural and functional characterization of PseC, an aminotransferase involved in the biosynthesis of pseudaminic acid, an essential flagellar modification in *Helicobacter pylori*." *J Biol Chem* **281**(13): 8907-16.
314. Schoenhofen, I.C., D.J. McNally, J.R. Brisson, and S.M. Logan (2006). "Elucidation of the CMP-pseudaminic acid pathway in *Helicobacter pylori*: synthesis from UDP-N-acetylglucosamine by a single enzymatic reaction." *Glycobiology* **16**(9): 8C-14C.
315. Schoenhofen, I.C., D.J. McNally, E. Vinogradov, D. Whitfield, N.M. Young, S. Dick, W.W. Wakarchuk, J.R. Brisson, and S.M. Logan (2006). "Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways." *J Biol Chem* **281**(2): 723-32.
316. Schoenhofen, I.C., E. Vinogradov, D.M. Whitfield, J.R. Brisson, and S.M. Logan (2009). "The CMP-legionaminic acid pathway in *Campylobacter*: biosynthesis involving novel GDP-linked precursors." *Glycobiology* **19**(7): 715-25.
317. Shaw, C.H., A.M. Ashby, A. Brown, C. Royal, G.J. Loake, and C.H. Shaw (1988). "*virA* and *virG* are the Ti-plasmid functions required for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards acetosyringone." *Mol Microbiol* **2**(3): 413-7.
318. Shen, A., H.D. Kamp, A. Grundling, and D.E. Higgins (2006). "A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression." *Genes Dev* **20**(23): 3283-95.
319. Shi, X., S. Wegener-Feldbrugge, S. Huntley, N. Hamann, R. Hedderich, and L. Sogaard-Andersen (2008). "Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*." *J Bacteriol* **190**(2): 613-24.
320. Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Ishikawa (2000). "Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS." *Nature* **407**(6800): 81-6.
321. Shimada, T., R. Sakazaki, and K. Suzuki (1985). "Peritrichous flagella in mesophilic strains of *Aeromonas*." *Jpn J Med Sci Biol* **38**(3): 141-5.
322. Shinoda, S. and K. Okamoto (1977). "Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella." *J Bacteriol* **129**(3): 1266-71.
323. Shinoda, S., I. Yakiyama, S. Yasui, Y.M. Kim, B. Ono, and S. Nakagami (1992). "Lateral flagella of vibrios: serological classification and genetical similarity." *Microbiol Immunol* **36**(3): 303-9.
324. Shnit-Orland, M., A. Sivan, and A. Kushmaro (2010). "*Shewanella corallii* sp. nov., a marine bacterium isolated from a Red Sea coral." *Int J Syst Evol Microbiol* **60**(Pt 10): 2293-7.
325. Simidu, U., K. Kita-Tsakamoto, T. Yasumoto, and M. Yotsu (1990). "Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin." *Int J Syst Bacteriol* **40**(4): 331-6.
326. Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, and U. Romling (2004). "GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility." *Mol Microbiol* **53**(4): 1123-34.
327. Sjoblad, R.D., C.W. Emala, and R.N. Doetsch (1983). "Invited review: bacterial flagellar sheaths: structures in search of a function." *Cell Motil* **3**(1): 93-103.
328. Skerratt, J.H., J.P. Bowman, and P.D. Nichols (2002). "*Shewanella olleyana* sp. nov., a marine species isolated from a temperate estuary which produces high levels of polyunsaturated fatty acids." *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(Pt 6): 2101-6.
329. Sockett, H., S. Yamaguchi, M. Kihara, V.M. Irikura, and R.M. Macnab (1992). "Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **174**(3): 793-806.
330. Song, W., F.S. Juhn, D.Q. Naiman, K.T. Konstantinidis, T.S. Gardner, and M.J. Ward (2008). "Predicting sigma²⁸ promoters in eleven *Shewanella* genomes." *FEMS Microbiol Lett* **283**(2): 223-30.

331. Song, Y.C., S. Jin, H. Louie, D. Ng, R. Lau, Y. Zhang, R. Weerasekera, S. Al Rashid, L.A. Ward, S.D. Der, and V.L. Chan (2004). "FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion." *Mol Microbiol* **53**(2): 541-53.
332. Soo, E.C., A.J. Aubry, S.M. Logan, P. Guerry, J.F. Kelly, N.M. Young, and P. Thibault (2004). "Selective detection and identification of sugar nucleotides by CE-electrospray-MS and its application to bacterial metabolomics." *Anal Chem* **76**(3): 619-26.
333. Sourjik, V. (2004). "Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis." *Trends Microbiol* **12**(12): 569-76.
334. Sourjik, V. and J.P. Armitage (2010). "Spatial organization in bacterial chemotaxis." *EMBO J* **29**(16): 2724-33.
335. Sourjik, V. and H.C. Berg (2002). "Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 123-7.
336. Sourjik, V. and N.S. Wingreen (2012). "Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis." *Curr Opin Cell Biol* **24**(2): 262-8.
337. Sowa, Y. and R.M. Berry (2008). "Bacterial flagellar motor." *Q Rev Biophys* **41**(2): 103-32.
338. Spudich, J.L. and D.E. Koshland, Jr. (1976). "Non-genetic individuality: chance in the single cell." *Nature* **262**(5568): 467-71.
339. Sravan Kumar, R., T.S. Sasi Jyothsna, C. Sasikala, C.N. Seong, C.H. Lim, S.C. Park, and V. Ramana Ch (2010). "*Shewanella fodinae* sp. nov., isolated from a coal mine and from a marine lagoon." *Int J Syst Evol Microbiol* **60**(Pt 7): 1649-54.
340. Stader, J., P. Matsumura, D. Vacante, G.E. Dean, and R.M. Macnab (1986). "Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *motB* gene and site-limited incorporation of its product into the cytoplasmic membrane." *J Bacteriol* **166**(1): 244-52.
341. Stenberg, E., E. Ringo, and A.R. Strom (1984). "Trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735: Na⁺-stimulated anaerobic transport in cells and membrane vesicles." *Appl Environ Microbiol* **47**(5): 1090-5.
342. Stewart, B.J. and L.L. McCarter (2003). "Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*." *J Bacteriol* **185**(15): 4508-18.
343. Sucharita, K., C. Sasikala, S.C. Park, K.S. Baik, C.N. Seong, and V. Ramana Ch (2009). "*Shewanella chilikensis* sp. nov., a moderately alkaliphilic gammaproteobacterium isolated from a lagoon." *Int J Syst Evol Microbiol* **59**(Pt 12): 3111-5.
344. Sung, H.R., J.H. Yoon, and S.Y. Ghim (2012). "*Shewanella dokdonensis* sp. nov., isolated from seawater." *Int J Syst Evol Microbiol* **62**(Pt 7): 1636-43.
345. Taguchi, F., S. Shibata, T. Suzuki, Y. Ogawa, S. Aizawa, K. Takeuchi, and Y. Ichinose (2008). "Effects of glycosylation on swimming ability and flagellar polymorphic transformation in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605." *J Bacteriol* **190**(2): 764-8.
346. Taguchi, F., R. Shimizu, Y. Inagaki, K. Toyoda, T. Shiraishi, and Y. Ichinose (2003). "Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction." *Plant Cell Physiol* **44**(3): 342-9.
347. Taguchi, F., K. Takeuchi, E. Katoh, K. Murata, T. Suzuki, M. Marutani, T. Kawasaki, M. Eguchi, S. Katoh, H. Kaku, C. Yasuda, Y. Inagaki, K. Toyoda, T. Shiraishi, and Y. Ichinose (2006). "Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*." *Cell Microbiol* **8**(6): 923-38.
348. Takeuchi, K., F. Taguchi, Y. Inagaki, K. Toyoda, T. Shiraishi, and Y. Ichinose (2003). "Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity." *J Bacteriol* **185**(22): 6658-65.
349. Tang, H., S. Billings, X. Wang, L. Sharp, and D.F. Blair (1995). "Regulated underexpression and overexpression of the FliN protein of *Escherichia coli* and evidence for an interaction between FliN and FliM in the flagellar motor." *J Bacteriol* **177**(12): 3496-503.
350. Tarrand, J.J., N.R. Krieg, and J. Dobreiner (1978). "A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov." *Can J Microbiol* **24**(8): 967-80.
351. Taylor, B.L. and D.E. Koshland, Jr. (1974). "Reversal of flagellar rotation in monotrichous and peritrichous bacteria: generation of changes in direction." *J Bacteriol* **119**(2): 640-2.
352. Terashima, H., H. Fukuoka, T. Yakushi, S. Kojima, and M. Homma (2006). "The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation." *Mol Microbiol* **62**(4): 1170-80.
353. Terashima, H., S. Kojima, and M. Homma (2010). "Functional transfer of an essential aspartate for the ion-binding site in the stator proteins of the bacterial flagellar motor." *J Mol Biol* **397**(3): 689-96.
354. Thanbichler, M., A.A. Iniesta, and L. Shapiro (2007). "A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*." *Nucleic Acids Res* **35**(20): e137.
355. Thattai, M. and A. van Oudenaarden (2004). "Stochastic gene expression in fluctuating environments." *Genetics* **167**(1): 523-30.
356. Thibault, P., S.M. Logan, J.F. Kelly, J.R. Brisson, C.P. Ewing, T.J. Trust, and P. Guerry (2001). "Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin." *J Biol Chem* **276**(37): 34862-70.
357. Thormann, K.M., S. Duttler, R.M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa, and A.M. Spormann (2006). "Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP." *J Bacteriol* **188**(7): 2681-91.
358. Thormann, K.M. and A. Paulick (2010). "Tuning the flagellar motor." *Microbiology* **156**(Pt 5): 1275-83.
359. Thormann, K.M., R.M. Saville, S. Shukla, D.A. Pelletier, and A.M. Spormann (2004). "Initial Phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1." *J Bacteriol* **186**(23): 8096-104.
360. Thormann, K.M., R.M. Saville, S. Shukla, and A.M. Spormann (2005). "Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms." *J Bacteriol* **187**(3): 1014-21.
361. Toffin, L., A. Bidault, P. Pignet, B.J. Tindall, A. Slobodkin, C. Kato, and D. Prieur (2004). "*Shewanella profunda* sp. nov., isolated from deep marine sediment of the Nankai Trough." *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 6): 1943-9.
362. Toft, C. and M.A. Fares (2008). "The evolution of the flagellar assembly pathway in endosymbiotic bacterial genomes." *Mol Biol Evol* **25**(9): 2069-76.
363. Toker, A.S., M. Kihara, and R.M. Macnab (1996). "Deletion analysis of the FliM flagellar switch protein of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **178**(24): 7069-79.

364. **Toker, A.S. and R.M. Macnab** (1997). "Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FlIM interact with FlIG, FlIN and CheY." *J Mol Biol* **273**(3): 623-34.
365. **Toutain, C.M., N.C. Caizza, M.E. Zegans, and G.A. O'Toole** (2007). "Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*." *Res Microbiol* **158**(5): 471-7.
366. **Toutain, C.M., M.E. Zegans, and G.A. O'Toole** (2005). "Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **187**(2): 771-7.
367. **Tripepi, M., J. You, S. Temel, O. Onder, D. Brisson, and M. Pohlschroder** (2012). "N-glycosylation of *Haloferax volcanii* flagellins requires known Agl proteins and is essential for biosynthesis of stable flagella." *J Bacteriol* **194**(18): 4876-87.
368. **Tso, W.W. and J. Adler** (1974). "Negative chemotaxis in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **118**(2): 560-76.
369. **Turner, L., W.S. Ryu, and H.C. Berg** (2000). "Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments." *J Bacteriol* **182**(10): 2793-801.
370. **Turner, L., A.S. Stern, and H.C. Berg** (2012). "Growth of flagellar filaments of *Escherichia coli* is independent of filament length." *J Bacteriol* **194**(10): 2437-42.
371. **Ulitzur, S.** (1975). "Effect of temperature, salts, pH, and other factors on the development of peritrichous flagella in *Vibrio alginolyticus*." *Arch Microbiol* **104**(3): 285-8.
372. **Urrutia, M.M., E.E. Roden, J.K. Fredrickson, and J.M. Zachara** (1998). "Microbial and surface chemistry controls on reduction of synthetic Fe(III) oxide minerals by the dissimilatory iron-reducing bacterium *Shewanella alga*." *Geomicrobiology Journal* **15**(4): 269-291.
373. **Urrutia, M.M., E.E. Roden, and J.M. Zachara** (1999). "Influence of aqueous and solid-phase Fe(II) complexants on microbial reduction of crystalline iron(III) oxides." *Environ Sci Technol* **33**(22): 4022-4028.
374. **Van Dellen, K.L., L. Houot, and P.I. Watnick** (2008). "Genetic analysis of *Vibrio cholerae* monolayer formation reveals a key role for $\Delta\Psi$ in the transition to permanent attachment." *J Bacteriol* **190**(24): 8185-96.
375. **Vegh, B.M., P. Gal, J. Dobo, P. Zavodszky, and F. Vonderviszt** (2006). "Localization of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin." *Biochem Biophys Res Commun* **345**(1): 93-8.
376. **Venkateswaran, K., M.E. Dollhopf, R. Aller, E. Stackebrandt, and K.H. Nealson** (1998). "*Shewanella amazonensis* sp. nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds." *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 965-72.
377. **Venkateswaran, K., D.P. Moser, M.E. Dollhopf, D.P. Lies, D.A. Saffarini, B.J. MacGregor, D.B. Ringelberg, D.C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and K.H. Nealson** (1999). "Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov." *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 705-24.
378. **Verma, P., P.K. Pandey, A.K. Gupta, H.J. Kim, K.S. Baik, C.N. Seong, M.S. Patole, and Y.S. Shouche** (2011). "*Shewanella indica* sp. nov., isolated from sediment of the Arabian Sea." *Int J Syst Evol Microbiol* **61**(Pt 9): 2058-64.
379. **Vladimirov, N. and V. Sourjik** (2009). "Chemotaxis: how bacteria use memory." *Biol Chem* **390**(11): 1097-104.
380. **Vogler, A.P., M. Homma, V.M. Irikura, and R.M. Macnab** (1991). "*Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of Flil to FOF1, vacuolar, and archaeobacterial ATPase subunits." *J Bacteriol* **173**(11): 3564-72.
381. **Voisin, S., R.S. Houlston, J. Kelly, J.R. Brisson, D. Watson, S.L. Bardy, K.F. Jarrell, and S.M. Logan** (2005). "Identification and characterization of the unique N-linked glycan common to the flagellins and S-layer glycoprotein of *Methanococcus voltae*." *J Biol Chem* **280**(17): 16586-93.
382. **Wadhams, G.H. and J.P. Armitage** (2004). "Making sense of it all: bacterial chemotaxis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(12): 1024-37.
383. **Wang, F., J. Wang, H. Jian, B. Zhang, S. Li, X. Zeng, L. Gao, D.H. Bartlett, J. Yu, S. Hu, and X. Xiao** (2008). "Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3." *PLoS One* **3**(4): e1937.
384. **Wang, F., P. Wang, M. Chen, and X. Xiao** (2004). "Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strains in deep-sea sediments from the west Pacific." *Extremophiles* **8**(2): 165-8.
385. **Wang, Q., A. Suzuki, S. Mariconda, S. Porwollik, and R.M. Harshey** (2005). "Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum." *EMBO J* **24**(11): 2034-42.
386. **Wei, Y., X. Wang, J. Liu, I. Nememan, A.H. Singh, H. Weiss, and B.R. Levin** (2011). "The population dynamics of bacteria in physically structured habitats and the adaptive virtue of random motility." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(10): 4047-52.
387. **Welch, M., K. Oosawa, S. Aizawa, and M. Eisenbach** (1993). "Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 8787-91.
388. **Wieland, F., G. Paul, and M. Sumper** (1985). "Halobacterial flagellins are sulfated glycoproteins." *J Biol Chem* **260**(28): 15180-5.
389. **Wielinga, B., M.M. Mizuba, C.M. Hansel, and S. Fendorf** (2001). "Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria." *Environ Sci Technol* **35**(3): 522-7.
390. **Wigneshweraraj, S., D. Bose, P.C. Burrows, N. Joly, J. Schumacher, M. Rappas, T. Pape, X. Zhang, P. Stockley, K. Severinov, and M. Buck** (2008). "Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor." *Mol Microbiol* **68**(3): 538-46.
391. **Wildung, R.E., Y.A. Gorby, K.M. Krupka, N.J. Hess, S.W. Li, A.E. Plymale, J.P. McKinley, and J.K. Fredrickson** (2000). "Effect of electron donor and solution chemistry on products of dissimilatory reduction of technetium by *Shewanella putrefaciens*." *Appl Environ Microbiol* **66**(6): 2451-60.
392. **Wilhelms, M., K.M. Fulton, S.M. Twine, J.M. Tomas, and S. Merino** (2012). "Differential glycosylation of polar and lateral flagellins in *Aeromonas hydrophila* AH-3." *J Biol Chem* **287**(33): 27851-62.
393. **Wilhelms, M., V. Gonzalez, J.M. Tomas, and S. Merino** (2013). "*Aeromonas hydrophila* lateral flagella gene transcriptional hierarchy." *J Bacteriol*.
394. **Wilhelms, M., R. Molero, J.G. Shaw, J.M. Tomas, and S. Merino** (2011). "Transcriptional hierarchy of *Aeromonas hydrophila* polar-flagellum genes." *J Bacteriol* **193**(19): 5179-90.
395. **Wilhelms, M., S. Vilches, R. Molero, J.G. Shaw, J.M. Tomas, and S. Merino** (2009). "Two redundant sodium-driven stator motor proteins are involved in *Aeromonas hydrophila* polar flagellum rotation." *J Bacteriol* **191**(7): 2206-17.

396. Williams, A.W., S. Yamaguchi, F. Togashi, S.I. Aizawa, I. Kawagishi, and R.M. Macnab (1996). "Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **178**(10): 2960-70.
397. Windel, N. (2011). "Untersuchung der Motilität und des bakteriellen Immunsystems in *Shewanella putrefaciens* CN-32." *Bachelor of Science Arbeit*.
398. Wu, L., J. Wang, P. Tang, H. Chen, and H. Gao (2011). "Genetic and molecular characterization of flagellar assembly in *Shewanella oneidensis*." *PLoS One* **6**(6): e21479.
399. Xie, L., T. Altindal, S. Chattopadhyay, and X.L. Wu (2011). "From the Cover: Bacterial flagellum as a propeller and as a rudder for efficient chemotaxis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(6): 2246-51.
400. Xu, M., J. Guo, Y. Cen, X. Zhong, W. Cao, and G. Sun (2005). "*Shewanella decolorationis* sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant." *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 1): 363-8.
401. Yakushi, T., J. Yang, H. Fukuoka, M. Homma, and D.F. Blair (2006). "Roles of charged residues of rotor and stator in flagellar rotation: comparative study using H⁺-driven and Na⁺-driven motors in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **188**(4): 1466-72.
402. Yamaguchi, S., S. Aizawa, M. Kihara, M. Isomura, C.J. Jones, and R.M. Macnab (1986). "Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **168**(3): 1172-9.
403. Yamashita, I., K. Hasegawa, H. Suzuki, F. Vonderviszt, Y. Mimori-Kiyosue, and K. Namba (1998). "Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction." *Nat Struct Biol* **5**(2): 125-32.
404. Yang, S.H., K.K. Kwon, H.S. Lee, and S.J. Kim (2006). "*Shewanella spongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge." *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 12): 2879-82.
405. Yang, S.H., J.H. Lee, J.S. Ryu, C. Kato, and S.J. Kim (2007). "*Shewanella donghaensis* sp. nov., a psychrophilic, piezosensitive bacterium producing high levels of polyunsaturated fatty acid, isolated from deep-sea sediments." *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(Pt 2): 208-12.
406. Yonekura, K., S. Maki, D.G. Morgan, D.J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada, and K. Namba (2000). "The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly." *Science* **290**(5499): 2148-52.
407. Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and K. Namba (2003). "Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy." *Nature* **424**(6949): 643-50.
408. Yoon, J.H., K.H. Kang, T.K. Oh, and Y.H. Park (2004). "*Shewanella gaetbuli* sp. nov., a slight halophile isolated from a tidal flat in Korea." *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 2): 487-91.
409. Yoon, J.H., S. Park, Y.T. Jung, and J.S. Lee (2012). "*Shewanella seohaensis* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment." *Antonie Van Leeuwenhoek* **102**(1): 149-56.
410. Yoon, J.H., S.H. Yeo, I.G. Kim, and T.K. Oh (2004). "*Shewanella marisflavi* sp. nov. and *Shewanella aquimarina* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea." *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 6): 2347-52.
411. Zhao, J.S., D. Manno, C. Beaulieu, L. Paquet, and J. Hawari (2005). "*Shewanella sediminis* sp. nov., a novel Na⁺-requiring and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading bacterium from marine sediment." *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 4): 1511-20.
412. Zhao, J.S., D. Manno, C. Leggiadro, D. O'Neil, and J. Hawari (2006). "*Shewanella halifaxensis* sp. nov., a novel obligately respiratory and denitrifying psychrophile." *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 1): 205-12.
413. Zhao, J.S., D. Manno, S. Thiboutot, G. Ampleman, and J. Hawari (2007). "*Shewanella canadensis* sp. nov. and *Shewanella atlantica* sp. nov., manganese dioxide- and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-reducing, psychrophilic marine bacteria." *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(Pt 9): 2155-62.
414. Zhou, J. and D.F. Blair (1997). "Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor." *J Mol Biol* **273**(2): 428-39.
415. Zhou, J., R.T. Fazio, and D.F. Blair (1995). "Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **251**(2): 237-42.
416. Zhou, J., S.A. Lloyd, and D.F. Blair (1998). "Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6436-41.

6 Appendix

Tabellen

Tabelle 15: Gene des polaren und lateralen Flagellensystems und der Chemotaxiskomponenten von *Shewanella putrefaciens* CN-32 – Lokus-Tag, Homologie-basierte Nomenklatur und putative Funktion der Genprodukte.

Lokus-Tag	Gen-Nomenklatur	annotierte Funktion des Proteins
Gene für polare Flagellen (Cluster 1)		
Sputcn32_2549		<i>flhB</i> Domänenprotein
Sputcn32_2550		konserviertes hypothetisches Protein
Sputcn32_2551	<i>cheW</i>	Chemotaxis Kupplungsprotein, verbindet MCPs und CheA
Sputcn32_2552	<i>cheW</i>	Chemotaxis Kupplungsprotein, verbindet MCPs und CheA
Sputcn32_2553		Cobyrinsäure a,c-Diamid Synthase; ParA Familie
Sputcn32_2554		hypothetisches Protein
Sputcn32_2555	<i>cheB</i>	Chemotaxis Methylesterase
Sputcn32_2556	<i>cheA</i>	Chemotaxis Histidinkinase
Sputcn32_2557	<i>cheZ</i>	CheY Phosphatase
Sputcn32_2558	<i>cheY</i>	Chemotaxis Antwortregulator, induziert Richtungsänderung der, Flagellendrehung, Interaktion mit FliMN,
Sputcn32_2559	<i>fliA₁</i>	Sigmafaktor, Sigma ²⁸
Sputcn32_2560	<i>flhG₁</i>	Cobyrinsäure a,c-Diamid Synthase
Sputcn32_2561	<i>flhF₁</i>	GTP-bindendes Signalerkennungspartikel SRP54, G-Domäne
Sputcn32_2562	<i>flhA₁</i>	Flagellenexport, Interaktion mit FliH-J, Initiatorprotein der Flagellenassemblierung in <i>E. coli</i> [190], (membranintegral)
Sputcn32_2563	<i>flhB₁</i>	Flagellenexport, Interaktion mit FliH-J
Sputcn32_2564	<i>fliR₁</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion
Sputcn32_2565	<i>fliQ₁</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion
Sputcn32_2566	<i>fliP₁</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion
Sputcn32_2567	<i>fliO₁</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion
Sputcn32_2568	<i>fliN₁</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, CheY-Interaktion
Sputcn32_2569	<i>fliM₁</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, CheY-Interaktion
Sputcn32_2570	<i>fliL₁</i>	Basalkörperprotein
Sputcn32_2571	<i>fliK₁</i>	Kontrollprotein für Hakenlänge
Sputcn32_2572	<i>fliJ₁</i>	Flagellenexport
Sputcn32_2573	<i>fliI₁</i>	ATPase des Flagellenexports
Sputcn32_2574	<i>fliH₁</i>	Flagellenexport-Protein, negativer Regulator von FliI
Sputcn32_2575	<i>fliG₁</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, Rotor-Stator Interaktion
Sputcn32_2576	<i>fliF₁</i>	MS-Ring Protein (Cytoplasmamembran und Supramembranös)
Sputcn32_2577	<i>fliE₁</i>	Basalkörperprotein, Verbindung zwischen MS-Ring und Stab
Sputcn32_2578	<i>fliR_{C1}</i>	Zwei-Komponenten Signal Transduktions Antwortregulator, Sigma ⁵⁴ -abhängiger Transkriptionsregulator
Sputcn32_2579	<i>fliB₁</i>	PAS-PAC Zwei-Komponenten Signaltransduktions Sensor-Histidinkinase
Sputcn32_2580	<i>fliA₁</i>	Sigma ⁵⁴ -abhängiger Transkriptionsregulator
Sputcn32_2581	<i>fliS₁</i>	Flagellin-spezifisches Chaperon
Sputcn32_2582	<i>fliT₁</i>	FliD-spezifisches Chaperon
Sputcn32_2583	<i>fliD₁</i>	HAP2, Kappenprotein des Filaments
Sputcn32_2584	<i>flaG₁</i>	Flagellenprotein
Sputcn32_2585	<i>flaB₁</i>	Flagellin
Sputcn32_2586	<i>flaA₁</i>	Flagellin
Sputcn32_2587	<i>flgL₁</i>	HAP3 (Verbindungsprotein zwischen Haken und Filament), zum Filament verbunden
Sputcn32_2588	<i>flgK₁</i>	HAP1 (Verbindungsprotein zwischen Haken und Filament), zum Haken verbunden
Sputcn32_2589	<i>flgJ₁</i>	Peptidoglykan Hydrolase
Sputcn32_2590	<i>flgI₁</i>	P-Ring (Peptidoglykan)
Sputcn32_2591	<i>flgH₁</i>	L-Ring (Lipopolysaccharidschicht)
Sputcn32_2592	<i>flgG₁</i>	Stabprotein (außen)
Sputcn32_2593	<i>flgF₁</i>	Stabprotein (innen)
Sputcn32_2594	<i>flgE₁</i>	Hakenprotein (Hauptbestandteil des Hakens)
Sputcn32_2595	<i>flgD₁</i>	Hakenprotein („Verschlussprotein“)
Sputcn32_2596	<i>flgC₁</i>	Stabprotein (innen)
Sputcn32_2597	<i>flgB₁</i>	Stabprotein (innen)
Sputcn32_2598	<i>cheR</i>	Chemotaxis Methylase, methyliert MCPs
Sputcn32_2599	<i>cheW</i>	Chemotaxis Kupplungsprotein, verbindet MCPs und CheA

Lokus-Tag	Gen-Nomenklatur	annotierte Funktion des Proteins
Sputcn32_2600	<i>flgA₁</i>	P-ring Chaperon
Sputcn32_2601	<i>flgM₁</i>	Anti-Sigma ²⁸ Faktor
Sputcn32_2602	<i>flgN₁</i>	FlgK-, FlgL-spezifisches Chaperon
Sputcn32_2603	<i>flgP₁</i>	Lipoprotein der äußeren Membran, wichtig für Motilität
Sputcn32_2604	<i>flgO₁</i>	Lipoprotein der äußeren Membran, wichtig für Motilität
Sputcn32_2605	<i>flgT₁</i>	H-Ring, Basalkörperprotein, Interaktion mit MotY

Gene für laterale Flagellen (Cluster 2)

Sputcn32_3444	<i>fis</i>	Transkriptionsregulator, Fis Familie
Sputcn32_3445		konserviertes hypothetisches Protein
Sputcn32_3446		Type IV Pilus Assemblierungsprotein
Sputcn32_3447	<i>motB</i>	Untereinheit des H ⁺ -Ionen abhängigen Stators, am Peptidoglykan verankert, wandelt H ⁺ -Ionenfluss in Energie um
Sputcn32_3448	<i>motA</i>	Untereinheit des H ⁺ -Ionen abhängigen Stators, übt Drehmoment gegenüber dem Rotor aus
Sputcn32_3449	<i>fliA₂</i>	Sigmafaktor, Sigma ²⁸
Sputcn32_3450	<i>fliL₂</i>	Basalkörperprotein
Sputcn32_3451	<i>fliK₂</i>	Kontrollprotein für Hakenlänge
Sputcn32_3452		konserviertes hypothetisches Protein
Sputcn32_3453	<i>fliS₂</i>	Flagellin-spezifisches chaperon
Sputcn32_3454	<i>fliD₂</i>	HAP2, Kappenprotein des Filaments
Sputcn32_3455	<i>flaB₂</i>	Flagellin
Sputcn32_3456	<i>flaA₂</i>	Flagellin
Sputcn32_3457		konserviertes hypothetisches Protein
Sputcn32_3458	<i>flgL₂</i>	HAP3 (Verbindungsprotein zwischen Haken und Filament), zum Filament verbunden
Sputcn32_3459	<i>flgK₂</i>	HAP1 (Verbindungsprotein zwischen Haken und Filament), zum Haken verbunden
Sputcn32_3460	<i>flgJ₂</i>	Peptidoglykan Hydrolase
Sputcn32_3461	<i>flgI₂</i>	P-Ring (Peptidoglykan)
Sputcn32_3462	<i>flgH₂</i>	L-Ring (Lipopolysaccharidschicht)
Sputcn32_3463	<i>flgG₂</i>	Stabprotein (außen)
Sputcn32_3464	<i>flgF₂</i>	Stabprotein (innen)
Sputcn32_3465	<i>flgE₂</i>	Hakenprotein (Hauptbestandteil des Hakens)
Sputcn32_3466	<i>flgD₂</i>	Hakenprotein („Verschlussprotein“)
Sputcn32_3467	<i>flgC₂</i>	Stabprotein (innen)
Sputcn32_3468	<i>flgB₂</i>	Stabprotein (innen)
Sputcn32_3469	<i>flgA₂</i>	P-ring Chaperon
Sputcn32_3470		konserviertes hypothetisches Protein
Sputcn32_3471		konserviertes hypothetisches Protein
Sputcn32_3472		konserviertes hypothetisches Protein
Sputcn32_3473	<i>fliI₂</i>	ATPase des Flagellenexports
Sputcn32_3474	<i>fliH₂</i>	negativer Regulator von FliI
Sputcn32_3475	<i>fliG₂</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, Rotor-Stator Interaktion
Sputcn32_3476	<i>fliF₂</i>	MS-Ring Protein (Cytoplasmamembran und Supramembranös)
Sputcn32_3477	<i>fliE₂</i>	Basalkörperprotein, Verbindung zwischen MS-Ring und Stab
Sputcn32_3478	<i>fliC₂</i>	Sigma ⁵⁴ -spezifischer Transkriptionsregulator
Sputcn32_3479	<i>fliM₂</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, CheY-Interaktion
Sputcn32_3480	<i>fliN₂</i>	C-Ring Protein (Cytosol), Teil des „Switch-Complex“, CheY-Interaktion
Sputcn32_3481	<i>fliP₂</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion
Sputcn32_3482	<i>fliQ₂</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion
Sputcn32_3483	<i>fliR₂</i>	Flagellenexport Typ III-Sekretion
Sputcn32_3484	<i>fliB₂</i>	Flagellenexport, Interaktion mit FliH–J, Initiatorprotein der Flagellenassemblierung in <i>E. coli</i> [190], (membranintegral)
Sputcn32_3485	<i>fliA₂</i>	Flagellenexport, Interaktion mit FliH–J
Sputcn32_3486		NAD(P)H Dehydrogenase (Quinon)

abseits liegende Gene des polaren Flagellensystems

Sputcn32_1278	<i>pomA</i>	Untereinheit des Na ⁺ -Ionen abhängigen Stators, übt Drehmoment gegenüber dem Rotor aus
Sputcn32_1279	<i>pomB</i>	Untereinheit des Na ⁺ -Ionen abhängigen Stators, am Peptidoglykan verankert, wandelt Na ⁺ -Ionenfluss in Energie um
Sputcn32_0748	<i>motX</i>	T-Ring, Bestandteil des Na ⁺ -Ionen abhängigen Motors
Sputcn32_1601	<i>motY</i>	T-Ring, Bestandteil des Na ⁺ -Ionen abhängigen Motors

Tabelle 16: Bioinformatischer Vergleich der Proteine des polaren (Cluster 1) und des lateralen (Cluster 2) Flagellensystems mittels BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Identitäten und Ähnlichkeiten sind in Prozent angegeben.

Flagellencuster 1		Flagellencuster 2		Identität und Ähnlichkeit	
Lokus-Tag	Gen	Lokus-Tag	Gen	Identität	Ähnlichkeit
Sputcn32_2556	<i>cheA</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2555	<i>cheB</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2551	<i>cheW</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2552	<i>cheW</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2599	<i>cheW</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2558	<i>cheY</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2557	<i>cheZ</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2584	<i>flaG₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2600	<i>flgA₁</i>	Sputcn32_3469	<i>flgA₂</i>	Identität = 44/171 (26%)	Ähnlichkeit = 76/171 (45%)
Sputcn32_2597	<i>flgB₁</i>	Sputcn32_3468	<i>flgB₂</i>	Identität = 57/134 (43%)	Ähnlichkeit = 85/134 (64%)
Sputcn32_2596	<i>flgC₁</i>	Sputcn32_3467	<i>flgC₂</i>	Identität = 58/138 (43%)	Ähnlichkeit = 89/138 (65%)
Sputcn32_2595	<i>flgD₁</i>	Sputcn32_3466	<i>flgD₂</i>	Identität = 48/200 (24%)	Ähnlichkeit = 94/200 (47%)
Sputcn32_2594	<i>flgE₁</i>	Sputcn32_3465	<i>flgE₂</i>	Identität = 158/453 (35%)	Ähnlichkeit = 232/453 (52%)
Sputcn32_2593	<i>flgF₁</i>	Sputcn32_3464	<i>flgF₂</i>	Identität = 116/246 (48%)	Ähnlichkeit = 157/246 (64%)
Sputcn32_2592	<i>flgG₁</i>	Sputcn32_3463	<i>flgG₂</i>	Identität = 134/262 (52%)	Ähnlichkeit = 182/262 (70%)
Sputcn32_2591	<i>flgH₁</i>	Sputcn32_3462	<i>flgH₂</i>	Identität = 69/182 (38%)	Ähnlichkeit = 103/182 (57%)
Sputcn32_2590	<i>flgI₁</i>	Sputcn32_3461	<i>flgI₂</i>	Identität = 179/352 (51%)	Ähnlichkeit = 247/352 (71%)
Sputcn32_2589	<i>flgJ₁</i>	Sputcn32_3460	<i>flgJ₂</i>	Identität = 31/76 (41%)	Ähnlichkeit = 50/76 (66%)
Sputcn32_2588	<i>flgK₁</i>	Sputcn32_3459	<i>flgK₂</i>	Identität = 122/384 (32%)	Ähnlichkeit = 192/384 (50%)
Sputcn32_2587	<i>flgL₁</i>	Sputcn32_3458	<i>flgL₂</i>	Identität = 49/163 (31%)	Ähnlichkeit = 86/163 (53%)
Sputcn32_2601	<i>flgM₁</i>	Sputcn32_3470	<i>flgM₂</i>	Identität = 26/93 (27%)	Ähnlichkeit = 52/93 (55%)
Sputcn32_2602	<i>flgN₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2605	<i>flgT₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2562	<i>flhA₁</i>	Sputcn32_3485	<i>flhA₂</i>	Identität = 353/697 (51%)	Ähnlichkeit = 488/697 (71%)
Sputcn32_2563	<i>flhB₁</i>	Sputcn32_3484	<i>flhB₂</i>	Identität = 134/365 (36%)	Ähnlichkeit = 222/365 (60%)
Sputcn32_2561	<i>flhF₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2560	<i>flhG₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2559	<i>fliA₁</i>	Sputcn32_3449	<i>fliA₂</i>	Identität = 78/223 (34%)	Ähnlichkeit = 125/223 (56%)
Sputcn32_2583	<i>fliD₁</i>	Sputcn32_3454	<i>fliD₂</i>	Identität = 124/470 (26%)	Ähnlichkeit = 214/470 (45%)
Sputcn32_2577	<i>fliE₁</i>	Sputcn32_3477	<i>fliE₂</i>	Identität = 33/110 (30%)	Ähnlichkeit = 59/110 (53%)
Sputcn32_2576	<i>fliF₁</i>	Sputcn32_3476	<i>fliF₂</i>	Identität = 144/462 (31%)	Ähnlichkeit = 243/462 (52%)
Sputcn32_2575	<i>fliG₁</i>	Sputcn32_3475	<i>fliG₂</i>	Identität = 100/320 (31%)	Ähnlichkeit = 170/320
Sputcn32_2574	<i>fliH₁</i>	Sputcn32_3474	<i>fliH₂</i>	Identität = 64/189 (33%)	Ähnlichkeit = 91/189 (48%)
Sputcn32_2573	<i>fliI₁</i>	Sputcn32_3473	<i>fliI₂</i>	Identität = 250/414 (60%)	Ähnlichkeit = 311/414 (75%)
Sputcn32_2572	<i>fliJ₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2571	<i>fliK₁</i>	Sputcn32_3451	<i>fliK₂</i>	Identität = 44/125 (35%)	Ähnlichkeit = 65/125 (52%)
Sputcn32_2570	<i>fliL₁</i>	Sputcn32_3450	<i>fliL₂</i>	Identität = 35/138 (25%)	Ähnlichkeit = 65/138 (47%)
Sputcn32_2569	<i>fliM₁</i>	Sputcn32_3479	<i>fliM₂</i>	Identität = 9/51 (17%)	Ähnlichkeit = 22/51 (43%)
Sputcn32_2568	<i>fliN₁</i>	Sputcn32_3480	<i>fliN₂</i>	Identität = 38/110 (34%)	Ähnlichkeit = 67/110 (60%)
Sputcn32_2567	<i>fliO₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2566	<i>fliP₁</i>	Sputcn32_3481	<i>fliP₂</i>	Identität = 122/215 (56%)	Ähnlichkeit = 165/215 (76%)
Sputcn32_2565	<i>fliQ₁</i>	Sputcn32_3482	<i>fliQ₂</i>	Identität = 48/89 (53%)	Ähnlichkeit = 66/89 (74%)
Sputcn32_2564	<i>fliR₁</i>	Sputcn32_3483	<i>fliR₂</i>	Identität = 87/232 (37%)	Ähnlichkeit = 147/232 (63%)
Sputcn32_2581	<i>fliS₁</i>	Sputcn32_3453	<i>fliS₂</i>	Identität = 32/115 (27%)	Ähnlichkeit = 72/115 (62%)
Sputcn32_2580	<i>fliA₁</i>	Sputcn32_3478	<i>fliA₂</i>	Identität = 179/359 (50%)	Ähnlichkeit = 237/359 (67%)
Sputcn32_2579	<i>fliB₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2578	<i>fliC₁</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_2549		nicht vorhanden			
Sputcn32_2550		nicht vorhanden			
Sputcn32_2553		nicht vorhanden			
Sputcn32_2582		nicht vorhanden			
Sputcn32_2585	<i>fliB₁</i>	Sputcn32_3455	<i>fliB₂</i>	Identität = 111/273 (40%)	Ähnlichkeit = 166/273 (60%)
Sputcn32_2586	<i>fliA₁</i>	Sputcn32_3456	<i>fliA₂</i>	Identität = 109/268 (40%)	Ähnlichkeit = 162/268 (60%)
Sputcn32_2598		nicht vorhanden			
Sputcn32_2603		nicht vorhanden			
Sputcn32_2604		nicht vorhanden			
Sputcn32_1278	<i>pomA</i>	Sputcn32_3448	<i>motA</i>	Identität = 29/120 (25%)	Ähnlichkeit = 51/120 (43%)
Sputcn32_1279	<i>pomB</i>	Sputcn32_3447	<i>motB</i>	Identität = 44/162 (28%)	Ähnlichkeit = 87/162 (54%)
Sputcn32_0748	<i>motX</i>	nicht vorhanden			
Sputcn32_1601	<i>motY</i>	nicht vorhanden			
nicht vorhanden		Sputcn32_3445			
nicht vorhanden		Sputcn32_3446	<i>pilZ</i>		
nicht vorhanden		Sputcn32_3452			
nicht vorhanden		Sputcn32_3457			
nicht vorhanden		Sputcn32_3470			

Flagellencluster 1		Flagellencluster 2		Identität und Ähnlichkeit	
Lokus-Tag	Gen	Lokus-Tag	Gen	Identität	Ähnlichkeit
nicht vorhanden		Sputcn32_3471			
nicht vorhanden		Sputcn32_3472			
nicht vorhanden		Sputcn32_3486			
nicht vorhanden		Sputcn32_3444	<i>fis</i>		

Abbildungen

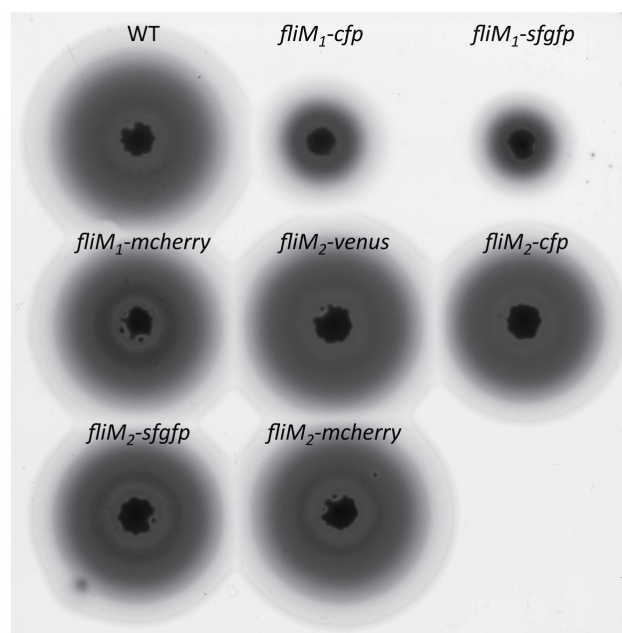


Abb. 38: Schwimmverhalten der Stämme mit Fluorophor-fusioniertem FliM₁ oder FliM₂.

Jeweils 3 µl logarithmisch gewachsener Kulturen der Stämme *fliM₁-cfp/sfgfp/mcherry* und *fliM₂-venus/cfp/sfgfp/mCherry* wurden neben dem Wildtyp 16 h in einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Agar inkubiert und anschließend die radiale Ausbreitung dokumentiert. Keiner der Fusionsprotein-Stämme war gegenüber dem Wildtyp bezüglich der Motilität eingeschränkt.

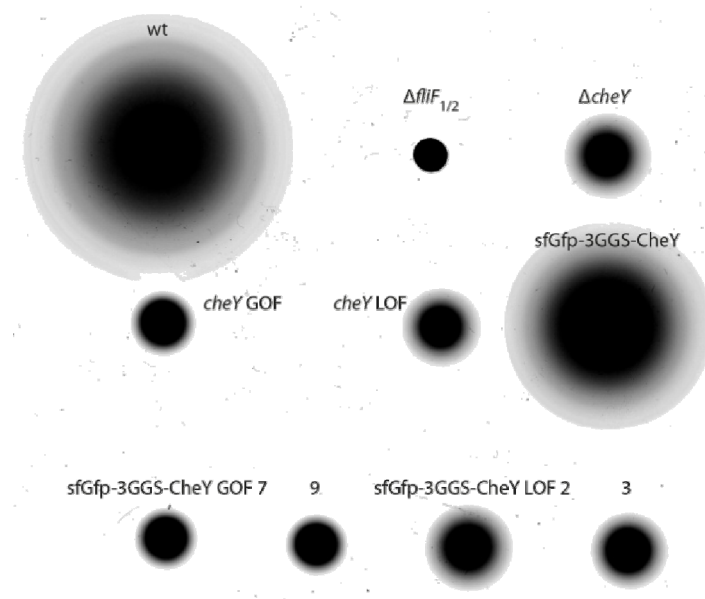


Abb. 39: Schwimmverhalten der Stämme mit Fluorophor-fusionierten CheY(-Versionen).

Jeweils 3 μ l logarithmisch gewachsener Kulturen der Stämme *sfGfp-3GGs-cheY*, *sfGfp-3GGs-cheY* GOF (Stamm Numer 7 und 9), *sfGfp-3GGs-cheY* LOF (Stamm Nummer 2 und 3) wurden neben dem Wildtyp und den Referenzstämmen 16 h in einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Agar inkubiert und anschließend die radiale Ausbreitung dokumentiert. Der Stamm *sfGfp-3GGs-cheY* war gegenüber dem Wildtyp bezüglich der Motilität leicht eingeschränkt. Die Stämme von *sfGfp-3GGs-cheY* GOF und *sfGfp-3GGs-cheY* LOF schwammen entsprechend der jeweiligen Referenzstämmen.

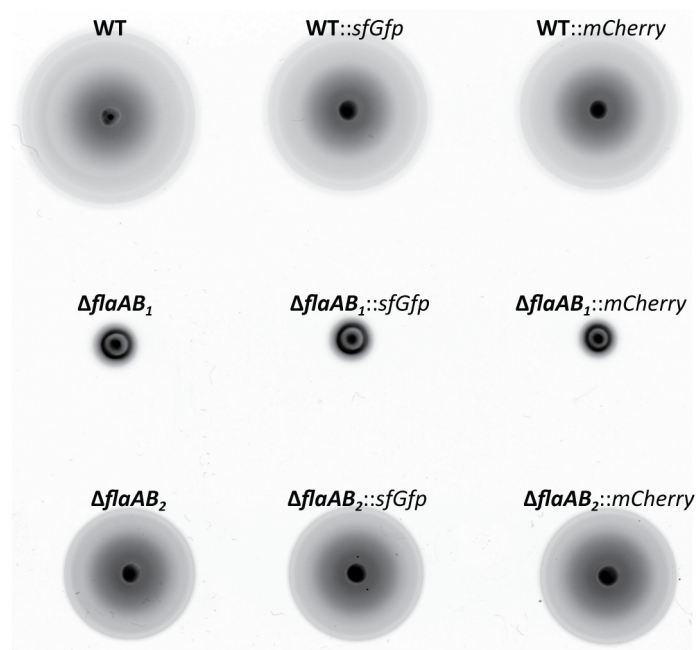


Abb. 40: Schwimmverhalten der lebendfluoreszentmarkierten Stämme.

Jeweils 3 μ l logarithmisch gewachsener Kulturen der Stämme Δ *flaAB*₁ (mit *motP::sfGfp/mCherry*) und Δ *flaAB*₂ (mit *motP::sfGfp/mCherry*) wurden neben dem Wildtyp (mit *motP::sfGfp/mCherry*) 16 h in einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Agar inkubiert und anschließend die radiale Ausbreitung dokumentiert. Keiner der lebendfluoreszentmarkierten Stämme war gegenüber den Referenzstämmen bezüglich der Motilität eingeschränkt.

Danksagung

Allen, die mich in den letzten Jahren direkt oder indirekt unterstützt, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen, und mir seelischen Beistand geleistet haben, möchte ich von ganzem Herzen danken!

In erster Linie möchte ich Dr. Kai Thormann für die spannenden Themen danken, die ich während meiner Doktorarbeit bearbeiten durfte und für die stete Bereitschaft zur Diskussion über meine Arbeit und alles was dazugehört. Nicht zuletzt auf seiner Begeisterung, seinen Ratschlägen und seinem Engagement fußt ein wesentlicher Teil des Erfolgs meiner Arbeit.

Ich möchte Prof. Dr. Peter Graumann herzlich dafür danken, dass er die Zweitgutachter-schaft für meine Doktorarbeit übernommen hat.

Ebenfalls danken möchte ich den Mitgliedern meines IMPRS-Wissenschafts-Komitees, Prof. Dr. Lotte Sogaard-Andersen, Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler und Dr. Sonja-Verena Albers, die mir durch ihre Expertise und Anregungen zu meiner Arbeit sehr geholfen haben.

Ganz besonders möchte ich auch meinen lieben Arbeitskollegen danken, Julia, Anja, Jürgen, Lucas, Suse, Magnus, Natalie, Andi, Tobi, Dani, Susan, Kerstin, Carina, Max, Florian und Jan, die mich auf meinem Weg begleitet haben und viel mehr als nur Arbeitskollegen für mich waren. Meinen Laborkollegen der AG Thormann möchte ich für die wirklich grandiose Zeit danken, die wir zusammen im Labor verbracht haben. Ihr seid die lustigste, liebenswerteste und vielleicht albernste Truppe, die ich kenne, auch wenn ich mir jetzt sicher bin, dass man es als Bayer außerhalb von Bayern wohl nie einfach hat! Dank Lucas weiß ich jetzt beispielsweise auch, dass ich nur darauf bedacht bin meine hedonistische Extravaganz zu maximieren (woran ich auch fleißig weiterarbeite)! Danke! Ich möchte Julia, Anja und Jürgen noch einmal ganz besonders für ihre Unterstützung im Labor, die tollen Gespräche und den vielfältigen und hilfreichen Einfluss auf mein wissenschaftliches Denken und meine Arbeit danken!

Außerdem bin ich meinen Kollaborationspartnern Andreas Klingl an der Philipps-Universität Marburg für seine Hilfe mit der Elektronenmikroskopie, Anne Dell und Paul Hitchen am Imperial College in London, sowie Mayumi Ishihara, Christian Heiss und Parastoo Azadi am CCRC der University of Georgia in Athens, für ihre Hilfe mit der massenspektrometrischen Analyse der Flagellenmodifizierung zu Dank verpflichtet.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich die Bachelor-Projekte von Natalie und Stefanie betreut. Ich danke Natalie für ihre Geduld, ihr Engagement und auch ihren Beitrag zu meiner Arbeit und, dass sie, trotz wiederholter Aufforderung Konjugationen durchzuführen, nicht verzweifelt ist. Stefanie hat sich von der schier endlosen Menge an transkriptionellen Studien nicht entmutigen lassen – danke. Jan möchte ich an dieser Stelle noch einmal meinen Dank für die Aufreinigung unglaublicher Mengen an Flagellenfilamenten aussprechen.

Nicht unerwähnt bleiben sollen hier die IMPRS-Koordinatoren Penelope Higgs und Chris van der Does und allen anderen Beteiligten der IMPRS, die zu meiner persönlichen und wissenschaftlichen Weiterentwicklung beigetragen haben, sowie Steffi W., Steffi L., Petra, Elisabeth, Reinhard und Manfred für ihren Beitrag zu einer tollen Arbeitsatmosphäre in der Ökophysiologie.

Nicht zuletzt gehört ein ganz besonderer Dank Julia, die mich in allen Lebenslagen begleitet, mir den Rücken gestärkt und ihre Liebe geschenkt hat. Sie hat mich aufgebaut, wenn ich nicht weiter wusste und mir Kraft gegeben, wo sie nur konnte. Auch hat sie so manchen schiefen Gedanken und krummen Satz, der meinen Fingern entströmte, gefunden und – siehe da – verständlich gemacht.

Insbesondere meinen Eltern, meinem Bruder und meiner ganzen Familie möchte ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung und ihre Liebe mein ganzes Leben hindurch danken! Meine Eltern haben es mir erst ermöglicht dahin zu kommen, wo ich heute bin! Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sebastian Bubendorfer
Geburtsdatum	01.08.1984
Geburtsort	München
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1991 – 1995	Grundschule am Pfanzeltplatz in München
1995 – 2004	sprachliches und naturwissenschaftlich-technologisches Heinrich-Heine-Gymnasium München
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

Oktober 2004 – März 2010	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
Juni 2007	Abschluss: Bachelor of Science
März 2010	Abschluss: Master of Science in "Molecular and Cellular Biology"
März 2010 – März 2013	Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg, Abteilung Ökophysiologie, Arbeitsgruppe Dr. Kai M. Thormann

Marburg an der Lahn, 14.03.2013

Sebastian Bubendorfer

*Science! Thou fair effusive ray
From the great source of mental Day,
Free, generous, and refin'd!
Descend with all thy treasures fraught,
Illumine each bewilder'd thought,
And bless my lab'ring mind.*

aus "The Hymn to Science"